



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**MECANISMOS DE REGULACIÓN Y DE ACCIÓN DE LA PROTEÍNA  
TRIM25 EN CÁNCER DE MAMA**

*TRABAJO MONOGRÁFICO DE ACTUALIZACIÓN*

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**SANDRA BEATRIZ ORDAZ GARCIA**



**CDMX, 2023**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:**           **Profesor: PREDRAZA CHAVERRI JOSE**  
**VOCAL:**               **Profesor: COELLO COUTIÑO MARTHA PATRICIA**  
**SECRETARIO:**       **Profesor: TECALCO CRUZ ANGELES CONCEPCION**  
**1er. SUPLENTE:**     **Profesor: GUTIERREZ AGUILAR MANUEL**  
**2º SUPLENTE:**       **Profesor: MENDOZA RODRIGUEZ CARMEN ADRIANA**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO (UACM)**  
**(MODALIDAD: AULA VIRTUAL)**

**ASESOR DEL TEMA: DRA. ÁNGELES CONCEPCIÓN TECALCO CRUZ**

**SUSTENTANTE: SANDRA BEATRIZ ORDAZ GARCIA**

## **Agradecimientos académicos**

El presente trabajo se desarrolló bajo la dirección de la **Dra. Ángeles Concepción Tecalco Cruz**, del Posgrado en Ciencias Genómicas, Plantel del Valle, de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México (UACM). Esta tesis fue apoyada por los Proyectos de Investigación del Colegio de Ciencia y Tecnología (CCyT) de la UACM con los números de folio **CCyT-2021-5** y **CCyT-2022-08**.

Se reconoce y agradece las recomendaciones otorgadas por:

Biol. Marcela Sosa Garrocho (Instituto de Fisiología Celular-UNAM)  
Dr. Josué O. Ramírez Jarquín (Instituto de Fisiología Celular-UNAM)  
Dra. Bibiana Ortega Domínguez (Instituto de Fisiología Celular-UNAM)  
Dra. Marina Macías Silva (Instituto de Fisiología Celular-UNAM)

Se reconocen y agradecen las observaciones y sugerencias para esta tesis, realizadas por:

Presidente: Dr. José Chaverri Pedraza

Vocal: Dra. Martha Patricia Coello Coutiño

Secretario: Dra. Angeles Tecalco

Suplente: Dr. Manuel Aguilar Gutiérrez

Suplente: Dra. Carmen Adriana Mendoza Rodríguez

# INDICE GENERAL

1.- Resumen.....	1
2.- Introducción.....	2
3.- Planteamiento de la investigación.....	6
4.- Objetivo.....	7
4.1.- Objetivos particulares.....	7
5.- Estrategia de investigación.....	8
6.- Capítulo 1. La familia de proteínas TRIM.....	9
6.1.-Clasificación de proteínas TRIM con base en el dominio C-terminal...10	
6.2.-Localización subcelular y modificaciones postraduccionales de las proteínas TRIM.....	12
6.3.-Proteínas TRIM: función bioquímica y participación en diversos procesos celulares.....	12
6.4.-Proteínas TRIM en la carcinogénesis.....	13
7.- Capítulos 2. Características de la proteína TRIM25.....	15
7.1Generalidades.....	15
8.- Capítulo 3. ISG15 como una proteína parecida a la ubiquitina que está implicada en cáncer de mama.....	17
8.1.-La ubiquitina y la ubiquitinación.....	17
8.2.-El gen y la proteína ISG15.....	21
8.3.-ISGilación de proteínas.....	22
8.4.-ISG15 libre y la ISGilación de proteínas en cáncer de mama.....	25
8.5.-Vías de señalización asociadas a ISG15 en cáncer de mamá.....	27
9.- Capítulo 4. Regulación de la expresión de TRIM25 en cáncer de mama.....	30
10.- Capítulo 5. Implicaciones de TRIM25 en cáncer de mama.....	36
11.- Discusión de resultados.....	43
12.- Conclusiones.....	46
13.- Referencias.....	48

## **Lista de abreviaturas**

**14-3-3 $\sigma$**  Regulador del ciclo celular

**3'UTR** Región no traducida tres prima

**4EHP** Proteína de unión a la estructura a cap de 5'RNAm

**A427** Línea celular de adenocarcinoma pulmonar

**AI** Inhibidores de la aromatasa

**AR** Receptor de andrógenos

**ARF** Dominios similares al factor de ribosilación ADP

**ARF** Factor de ribosilación de ADP

**ATBF1** Factor de unión al motivo AT1

**ATP** Adenosín trifosfato

**ATXN1L** Ataxina 1

**BRCA1** Cáncer de seno1 (gen)

**BRCA2** Cáncer de seno 2 (gen)

**BROMO** Bromodominio

**CC** Hélice superenrollada

**CDK** Cinasas dependientes de ciclina

**CIC** Capicua

**Cyc** Ciclinas

**DICER** Ribonucleasa de la familia RNAasas III

**DROSHA** Ribonucleasa III codificada por el gen DROSHA

**Dubs** Proteínas desconjugantes de ubiquitina

**E2** 17  $\beta$ -estradiol

**EFP** Proteína de dedo sensible a estrógeno (TRIM25)

**ERE** Elemento de respuesta a estrógenos

**ER $\alpha$**  Receptor de estrógenos alfa

**ESR1** Gen ER $\alpha$

**EMT** Transición epitelio-mesénquima

**FIL** Filamina tipo Ig

**FNIII** Fibronectina tipo III

**HECT** Moléculas que contienen dominios homólogos a E6AP en el extremo carboxilo-terminal

**HER2** o **ERBB2** Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano

**HHARI** Proteína ligasa

**IARC** Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer

**IFN** Interferón

**IGF2BP3** Factor de crecimiento similar a la Insulina

**IFNAR** Receptor de IFN tipo I

**IQGAP1** Proteína activadora de GTPasa1

**IRFs** Factores Reguladores de Interferón

**ISG15** Proteína codificada por el gen 15 estimulado por interferón

**JAK/STAT** Vía de señalización de citocinas Janus cinasa/transductor de señal y activador de transcripción

**Keap1** Proteína tipo Kelch, codificada por el gen Keap1

**Ki67** Marcador celular de proliferación

**KLF5** Factor Kruppel-like 5

**KSRI** Supresor de quinasas de Ras 1

**LPS** Lipopolisacárido

**MATH** Dominios de homología del factor asociado al receptor de necrosis tumoral

**MCF-7** Línea celular de cáncer de mama ER $\alpha$

**MDA-MB-231** Línea celular de cáncer de mama triple negativo

**MHCII** Complejo principal de histocompatibilidad

**miRNA** Micro RNA

**ncRNA** RNA pequeños no codificantes

**NF- $\kappa$ B** Factor Nuclear kappa-B

**NK** Células del sistema inmune, células asesinas

**NMIIA** Miosina no muscular IIA

**NR3A1** Miembro del grupo A de la subfamilia 3 del receptor nuclear

**Nrf2** Factor nuclear eritroide

**p53** Proteína supresora de tumores

**PHD** Homeodominio vegetal

**PR** Receptor de progesterona

**PU.1** Factor de transcripción expresado en linfocitos B

**RBP** Proteínas de unión a RN

**RING** Dominio Really Interesting New Gene

**RISC** Complejo proteico de silenciamiento inducido por miRNA, compuesto por 4 proteínas Argonaute (AGO1-4) y proteínas GW 182 de unión a Argonaute

**SERD** Degradadores selectivos del receptor de estrógenos

**SERM** Moduladores selectivos del receptor de estrógenos

**STAT1** Factor de transcripción codificado por el gen STAT1

**TM** Región transmembranal

**TRIM** Proteínas con motivo tripartito

**TRIM25** Proteína con motivo tripartito 25

**Ub** Ubiquitina

**UbCH8** Proteínas de conjugación en la ISGilación y Ubiquitinación

**Ube1L** Proteína activadora en el proceso de ISGilación

**UPS** Sistema Ubiquitina-Proteasoma

**USP18** Proteína desISGilasa

**ZBTB7A** Proteína 7A con dedo de zinc y dominio BTB codificada por el gen ZBTB7A

**ZR-75-1** Línea celular de cáncer de mama ductal

## 1.-Resumen

El cáncer de mama es un grave problema de salud a nivel mundial. Más del 75% de los casos de cáncer de mama expresan al receptor de estrógenos alfa (ER $\alpha$ ), mientras que el resto carece de la expresión de este receptor. En este contexto, el ER $\alpha$  regula la expresión de varios genes pro-tumor, por lo que la mayoría de los tratamientos farmacológicos tienen como blanco a este receptor. Sin embargo, se puede tener o adquirir una resistencia a dichos tratamientos, y los mecanismos implicados no son conocidos. Muchas otras vías de señalización, factores y modificaciones postraduccionales parecen también participar en la progresión del CM. Uno de estos factores es ISG15 (por su nombre en inglés *Interferon stimulated gene 15*), una proteína parecida a la ubiquitina de 15kDa. El sistema de ISGilación es un sistema parecido a la ubiquitinación, que se efectúa por tres enzimas que actúan secuencialmente para activar (E1), conjugar (E2) y finalmente, a través de las enzimas E3-ligasas, unir covalentemente ISG15 a sus proteínas blanco para modificarlas a nivel postraducciona. A diferencia del sistema de ubiquitinación que consta de 600 enzimas E3-ligasas de ubiquitina, el sistema de ISGilación consta de tres E3-ligasas: HERC5, HHARI y TRIM25. La proteína TRIM25 está emergiendo como un factor central en el cáncer de mama debido a su regulación y función, dado que: 1) los estrógenos y los interferones modulan la expresión del gen *TRIM25*, y la 2) la proteína TRIM25 tiene actividad como enzima E3-ligasa para las proteínas ubiquitina e ISG15. En consecuencia, los proteomas del tejido mamario se ven afectados por TRIM25, asociándose con el desarrollo de tumores y metástasis. En este trabajo monográfico de actualización se investigó, integró y discutió los hallazgos sobre los mecanismos implicados en la regulación de la expresión de *TRIM25* y su relevancia funcional en cáncer de mama. Con base en esta investigación se sugiere que TRIM25 podría ser un potencial biomarcador y un factor clave en la progresión del cáncer de mama, pero más estudios son requeridos para definir utilidad como blanco de nuevas estrategias terapéuticas y de detección.

## 2.-Introducción

El cáncer de mama se define como un conjunto de neoplasias mamarias. Se considera un problema a nivel mundial pues es el cáncer más prevalente y la principal causa de mortalidad de mujeres por cáncer a nivel mundial, de acuerdo con la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) (Bray et al., 2018; Ferlay et al., 2019).

En el 2012, el cáncer de mama fue el segundo cáncer con mayor frecuencia de diagnóstico en todo el mundo, se diagnosticaron aproximadamente 1.67 millones de nuevos casos. En 2018, el diagnóstico de nuevos casos fue de 2.1 millones (11.6%) de mujeres y alrededor de 627 mil (6.6%) de las pacientes murieron a causa de este padecimiento (Januškevičienė & Petrikaitė, 2019; Kolak et al., 2017). Esto lo convierte en una prioridad mundial. Además, aunque los hombres tienen el peor pronóstico de supervivencia en este padecimiento, el porcentaje de morbilidad es mayor en mujeres (N. Liu et al., 2018). De manera importante, este cáncer se presenta con mayor frecuencia en mujeres durante la transición menopáusica, 80% de los casos se presentan en mujeres de 50 años o más (Kolak et al., 2017).

Se calcula que un 33% de mujeres de 20 años y un 22% de mujeres de 30 años desarrollan cáncer de mamá debido a mutaciones genéticas. Existen muchos genes involucrados en el cáncer de mamá hereditario, pero son los genes BRCA1 Y BRCA2 los que mutan con mayor frecuencia y son responsables del 66% al 75% de los casos de cáncer de mamá hereditario (Bray et al., 2018; Ferlay et al., 2019; Menen & Hunt, 2016). BRCA1 y BRCA2 son genes supresores de tumores que participan en la reparación a través de recombinación homóloga. Las mutaciones de la línea germinal en estos genes conducen a un mayor riesgo de padecer cáncer de mama (Sachdev et al., 2019). De este modo, se estima que alrededor del 5-10% de todos los casos de este cáncer son causados por mutaciones genéticas heredadas de uno de los padres, mientras que el 90-95% restante de los casos está relacionado con factores ambientales y el estilo de vida (Kolak et al., 2017).

Existe evidencia de que el estilo de vida urbanizada y factores ambientales influyen en el desarrollo de este cáncer. Los hábitos de dieta alta en grasas, consumo de alcohol, falta de ejercicio físico, el uso de terapias hormonales y la decisión de tener el primer parto a una edad tardía son factores que aumentan la probabilidad de desarrollar cáncer de glándula mamaria, sumado a una probable predisposición genética (Kolak et al., 2017). Adicionalmente, es importante mencionar que, el 80% de los casos de tumores mamarios se desarrollan en los conductos mamarios siendo habitualmente invasivos (carcinoma ductal invasivo) (Aleskandarany et al., 2016; Turashvili & Brogi, 2017).

La identificación del cáncer mama se basa en el uso de los siguientes biomarcadores: receptor de estrógenos alfa ( $ER\alpha$ ), receptor de progesterona (PR), receptor de andrógenos (AR) y receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2 o ERBB2) (Bertucci et al., 2012; Dai et al., 2016). Basándose en la detección, mediante análisis inmunohistoquímico, de estos biomarcadores y de un marcador celular de proliferación (Ki67), la Conferencia Internacional sobre Cáncer de Mama de St. Gallen recomienda la clasificación de los cánceres de mama en cuatro diferentes subtipos (Goldhirsch et al., 2013).

I. Luminal tipo A:  $ER\alpha$  +, PR  $\geq 20\%$ , HER2-, Ki67  $< 20\%$ .

II. Luminal tipo B:  $ER\alpha$  +, PR  $< 20\%$  y / o HER2 + y / o Ki67  $\geq 20\%$ .

III. HER2 sobre expresado:  $ER\alpha$ -, PR-, HER2 +.

IV. Triple Negativo o Basal:  $ER\alpha$ -, PR-, HER2-.

El subtipo luminal A es el más común entre los casos de cáncer de mama invasivos (40-50%) y puede ser tratado solo con terapia endocrina. El subtipo luminal B requiere quimioterapia adicional a la terapia endocrina, por lo general tiene peor pronóstico que el luminal A. El subtipo que sobre expresa HER2, aunque es muy agresivo, responde satisfactoriamente a la terapia dirigida anti-HER2. Por el contrario, el cáncer de mama de tipo basal tiene el peor pronóstico, pues no es candidato para la terapia endocrina (Tsang & Tse, 2020). El cáncer de mama basal normalmente se ha tratado con cirugía, acompañado de quimioterapia que consta

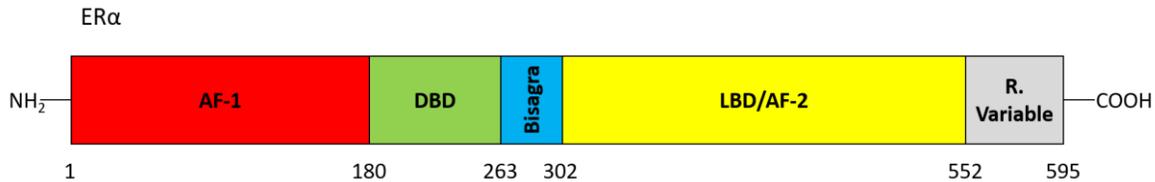
de medicamentos como las antraciclinas, la ciclofosfamida, los taxanos, el talazoparib y agentes alquilantes como el carboplatino y el cisplatino. Sin embargo, recientemente se han propuesto otras terapias que incluyen a la inmunoterapia y la lumpectomía (cirugía con conservación de la mama) seguida de radioterapia. Aunque este tipo de terapias han mostrado buenos resultados, algunos pacientes han mostrado quimio- y radio-resistencia (Bergin & Loi, 2019; Moran, 2015).

El ER $\alpha$  es crucial para la clasificación de cáncer de mama pues más del 75% de todos los casos de cáncer de mama lo expresan y se clasifican como cáncer de mama ER $\alpha$ +, así, los casos que no expresan ER $\alpha$  se clasifican como cáncer de mama ER $\alpha$ - (Bertucci et al., 2012; Dai et al., 2016). La mayoría de los carcinomas mamarios pueden proliferar en respuesta a los estrógenos a través de ER $\alpha$ . ER $\alpha$  participa en la proliferación, supervivencia y migración de las células del cáncer de mama que contribuyen al crecimiento tumoral (Xiao et al., 2019).

El receptor nuclear ER $\alpha$  es una proteína de 595 aminoácidos con un peso molecular de 66kDa, que pertenece al grupo A de la subfamilia 3 del receptor nuclear (NR3A1), codificada por el gen *ESR1*. Este receptor actúa como un factor de transcripción ya que tiene la capacidad de unirse a DNA, puede ser reconocido y activado por hormonas estrogénicas, una de ellas es la hormona 17  $\beta$ -estradiol (E2) la cual es la más abundante. Por lo tanto, la principal función del ER $\alpha$  es la de un factor de transcripción activado por estrógenos, pero puede también funcionar como un mediador de las vías de señalización, cuando dicho receptor se encuentra en el citoplasma o asociado a la membrana celular mediante palmitoilación (Kumar et al., 2011; Mader et al., 1993; Prossnitz & Barton, 2011).

La proteína ER $\alpha$  está conformada por 4 dominios principales, entre ellos se encuentran: los dominios, AF-1 y AF-2, que tienen función de activación, el dominio DBD de unión a DNA y el dominio LBD de unión a ligando para E2. La región N-terminal contiene el dominio AF-1, seguido del DBD que es importante para la dimerización y la unión a secuencias de DNA específicas (Kumar et al., 2011; Mader et al., 1993). En la región C-terminal se encuentran AF-2 y LBD. Después de DBD, hay una región de bisagra que contribuye a una sinergia funcional entre los dominios

AF-1 y AF-2 que permiten que ER $\alpha$  interactúe con varios reguladores transcripcionales de manera independiente o dependiente de E2 (**Fig. 1**) (Métivier et al., 2001; Zwart et al., 2010).



**Figura 1.** Se muestra la organización del receptor de estrógeno alfa (ER $\alpha$ ). Cada dominio tiene un color diferente: dominio amino terminal, AF1, en rojo; dominio de unión a DNA (DBD) en verde; región bisagra en azul, dominio de unión a ligando (LBD), AF-2, en amarillo; región variable del extremo c-terminal en gris. También se muestra el número de aminoácidos para cada dominio. Modificada de Kumar et al., 2011.

La detección de ER $\alpha$  en pacientes con cáncer de mama es de gran importancia para la selección de un tratamiento. Las terapias endocrinas para este tratamiento incluyen degradadores selectivos del receptor de estrógenos (SERD), moduladores selectivos del receptor de estrógeno (SERM) e inhibidores de la aromatasa (AI). Los SERD controlan la estabilidad de ER $\alpha$ ; los SERM son reguladores de la actividad ER $\alpha$ , mientras que los AI detienen la producción de la hormona estradiol. Por tanto, ER $\alpha$  es un objetivo directo de SERD y SERM, que son anti-estrógenos que se unen al LBD de este receptor; por ejemplo, fulvestrant es un SERD que induce la degradación de ER $\alpha$  por el sistema ubiquitina-proteasoma (UPS). Por el contrario, el tamoxifeno es un SERM que se une a ER $\alpha$ , bloqueando la unión de la hormona E2 a ER $\alpha$  y favoreciendo el reclutamiento de correpresores transcripcionales, en las células de cáncer de mama (Howell et al., 2004; Wardell et al., 2011). Sin embargo, algunos pacientes con cáncer de mama pueden mostrar una resistencia de *novo* o una resistencia adquirida a las terapias endocrinas mediante mecanismos que hasta ahora no se conocen completamente (Osborne & Schiff, 2011).

Se sabe que entre el 20 y 30% de los pacientes con cáncer de mama pueden desarrollar metástasis después del tratamiento del tumor primario, y

aproximadamente el 90% de las muertes relacionadas con el cáncer se atribuyen a metástasis (Liang et al., 2020).

Los pacientes con cáncer de glándula mamaria son propensos a desarrollar metástasis en distintos órganos, incluidos los huesos, los pulmones, el hígado y el cerebro, lo que se denomina heterogeneidad metastásica y conduce a respuestas variadas en el tratamiento y en el pronóstico del paciente. Del 15 al 30% de las pacientes con cáncer de mama metastásico pueden desarrollar metástasis cerebral, lo que representa una limitante en la calidad y esperanza de vida en muchas pacientes (Liang et al., 2020). Por ejemplo, el uso de terapia anti-HER2 (trastuzumab y pertuzumab) ha prolongado significativamente la supervivencia de pacientes con cáncer de mama HER2 positivo. Sin embargo, se sabe que el 50% de las pacientes con cáncer de mama avanzado HER2 positivo morirán por afección cerebral (Liang et al., 2020).

Existen muchas investigaciones enfocadas en la búsqueda de biomoléculas que puedan ayudar a desarrollar una terapia eficaz contra el cáncer de mama. Este trabajo se enfoca en la ligasa E3, TRIM25 también llamada EFP (TRM25/EFP), la cual media la ubiquitinación y promueve la degradación vía proteasoma del ER $\alpha$  en células de cáncer de mama (Xiao et al., 2019). TRIM25 además de estar implicado en el desarrollo de cáncer de mama está asociado con cáncer de ovario, de endometrio y de pulmón, esto lo convierte en un marcador de mal pronóstico. Por lo tanto, TRIM25 podría ser un objetivo en el diagnóstico y en la terapia para varios tipos de cáncer, teniendo una función central en cáncer de mama, como se muestra más adelante en el presente trabajo.

### **3.-Planteamiento de la investigación**

La proteína TRIM25 está emergiendo como un factor central en el cáncer de mama debido a su regulación y función, dado que 1) los estrógenos modulan la expresión del gen TRIM25, y 2) la proteína TRIM25 tiene actividad como enzima E3-ligasa para las proteínas ubiquitina e ISG15. En consecuencia, los proteomas del tejido mamario se ven afectados por TRIM25, asociándose con el desarrollo de tumores y metástasis.

Esta investigación pretende conocer los mecanismos de regulación y las funciones de TRIM25 en el contexto de cáncer de mama, y de acuerdo a esta información, conocer su potencial como un biomarcador y como un blanco de nuevas estrategias terapéuticas para este tipo de cáncer.

#### **4.-Objetivo**

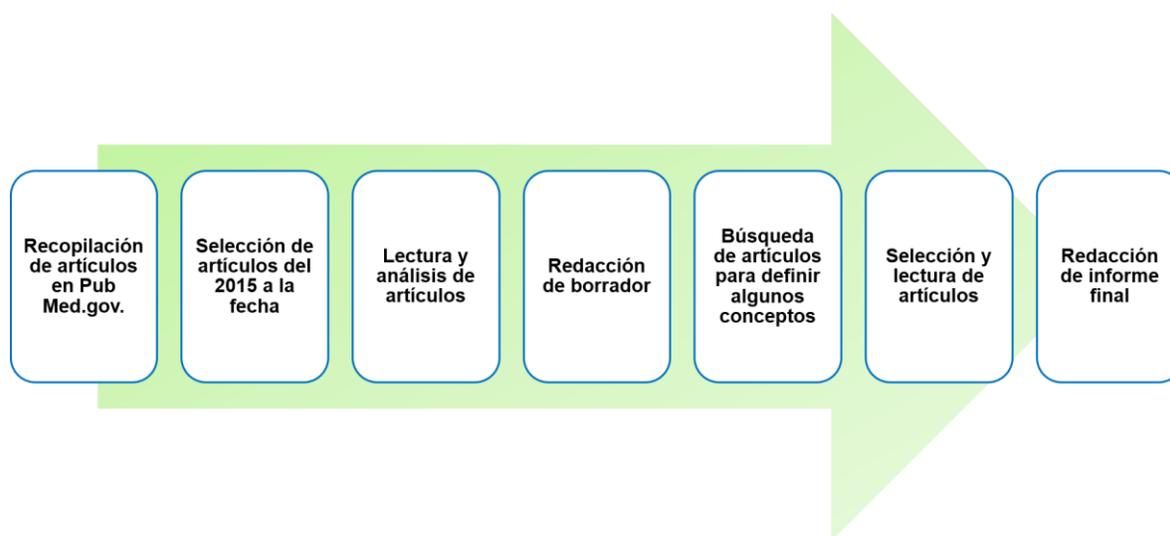
Investigar, integrar y discutir los hallazgos sobre los mecanismos implicados en la regulación de la expresión de TRIM25 y su relevancia funcional en el cáncer de mama como un potencial biomarcador y blanco terapéutico para esta patología.

##### **4.1.-Objetivos particulares**

1. Recopilar información sobre la familia de proteínas TRIM
2. Investigar las características de la proteína TRIM25
3. Analizar la participación de TRIM25 en los procesos de ubiquitinación e ISGilación.
4. Definir los mecanismos de regulación de la expresión de *TRIM25* en células de cáncer de mama
5. Evaluar las implicaciones reportados para TRIM25 en los tumores mamarios

## 5.-Estrategia de investigación

Para la recopilación de artículos se usó la base de datos bibliográfica Pub Med.gov. Las palabras empleadas para la búsqueda fueron: TRIM proteins, Breast cancer, TRIM25 and Breast cancer, EFP and Breast cancer, TRIM25 and ISG15 y EFP and ISG15.



**Esquema 1.** Estrategia de investigación para la elaboración de este trabajo monográfico de actualización.

## 6.-Capítulo 1

### *La familia de proteínas TRIM*

Las proteínas con motivo tripartito (TRIM) son una subfamilia de ligasas de ubiquitina E3 que controlan importantes procesos celulares como la señalización intracelular, la inmunidad innata, la transcripción, la autofagia y la carcinogénesis. Están presentes en la mayoría de eucariotas, pero el número de miembros de la familia varía entre especies; en humanos hay más de 80 miembros, en ratones alrededor de 64 miembros, en gusanos aproximadamente 20 y en moscas menos de 10, lo que sugiere que el número total de genes TRIM se correlaciona con el grado de evolución del organismo (Van Gent et al., 2018).

Estas proteínas mantienen una estructura conservada y ordenada del extremo N-terminal al extremo C-terminal. El extremo N-terminal está formado por tres dominios: el dominio dedos de zinc RING, uno o dos dominios B-box tipo dedos de zinc, y un dominio bobina enrollada o hélice superenrollada (del inglés: coiled-coil, CC). A esta estructura también se le conoce como motivo RBCC.

El dominio RING (Really Interesting New Gene), presente en la mayoría de las proteínas TRIM, contiene un motivo de dedo de zinc de 10 a 20 aminoácidos iniciando con la metionina en la posición N-terminal de casi todas las proteínas que lo contienen (Ozato, 2008). Se ha demostrado que el dominio RING de muchos miembros de la familia TRIM, incluidos TRIM5 $\alpha$ , TRIM8, TRIM11, TRIM21, TRIM22 y TRIM25, confiere actividad de ubiquitina ligasa E3, lo que les permite mediar en los eventos de ubiquitilación. Se sabe que la actividad de la ubiquitina ligasa E3 de este dominio es crucial para las funciones antivirales de algunas proteínas TRIM y para mediar las vías de señalización que siguen a la activación de receptores del sistema inmune innato. Curiosamente, TRIM25 también puede modificarse a sí misma y a otras proteínas conjugando ISG15 (Ozato, 2008). Además, se sabe que los dominios RING de las proteínas TRIM19 y TRIM63 se asocian con la enzima conjugadora SUMO UBE2I (enzima conjugadora de ubiquitina E2I), lo que sugiere que podrían estar involucrados en la sumoilación. Los dominios B-box también contienen motivos de dedos de zinc, las proteínas TRIM pueden contener una o dos

de estas estructuras, aunque B-box 1 (B1) nunca está presente sin B-box (B2). Si bien el papel funcional de los dominios B-box sigue siendo enigmático, se ha demostrado que modulan el autoensamblaje, la actividad de ligasa E3 de ubiquitina, las interacciones proteicas de ciertas proteínas TRIM y la unión a DNA (Kawai & Akira, 2011; Ozato, 2008).

Los dominios B-box se encuentran junto al dominio hélice superenrollada. Este último dominio media las interacciones con otros miembros de la familia TRIM y otras proteínas. Se ha demostrado que los dominios en hélice superenrollada son diversos, varían de estructuras con un solo espiral hasta estructuras con tres subdominios en espiral. Las interacciones proteína-proteína que involucran dominios en bobina promueven la generación de complejos de alta masa molecular que, entre otras funciones, definen estructuras subcelulares específicas (Ozato, 2008).

**6.1.-Clasificación de proteínas TRIM con base en el dominio C-terminal.** Las proteínas TRIM se pueden clasificar en 11 subfamilias (C-I a C-XI) con base en las diferentes estructuras de sus regiones C-terminales. La clasificación de las familias se muestra en la **Tabla 1** (Kawai & Akira, 2011; Williams et al., 2019). El dominio C-terminal generalmente actúa como un andamio de interacción proteína-proteína, pero también puede tener actividad enzimática o unirse a ácidos nucleicos. Las regiones C-terminales más comunes son el dominio PRY de ~61 aminoácidos de longitud y el dominio SPRY de ~140 aminoácidos de longitud, se pueden encontrar individualmente o en combinación (PRY-SPRY) (Ozato, 2008; Williams et al., 2019).

El dominio SPRY se conservan evolutivamente en mamíferos, plantas y hongos, mientras que el dominio de fusión PRY-SPRY (también conocido como dominio B30.2) se encuentra solo en vertebrados, estos dominios median las interacciones proteína-proteína. Otros dominios C-terminales incluyen; One Signature (COS) responsable de la unión de proteínas a los microtúbulos, fibronectina tipo III (FNIII) que media la unión al DNA y la heparina, homeodominio vegetal (PHD) involucrado en la regulación génica mediada por cromatina, bromodominio (BROMO) encargado de reconocer residuos de lisina acetilada además se encuentra en seguida del

dominio PHD y juntos median la represión transcripcional, la región rica en ácido (ACID), filamina tipo Ig (FIL) implicada en la dimerización y la reticulación de actina, repeticiones NCL-1, HT2A y LIN-41 (NHL) que pueden participar en interacciones proteína-proteína, meprina, dominios de homología del factor asociado al receptor de necrosis tumoral (MATH) necesario para las interacciones de recepción por algunas proteínas de TRAF, dominios similares al factor de ribosilación de ADP (ARF) implicados en el tráfico vesicular intracelular y la región transmembranal (TM) (Hatakeyama, 2017; Kawai & Akira, 2011).

**Tabla1.** Estructuras de las proteínas con motivo tripartito (TRIM) agrupadas por familia. Su clasificación se basa en la estructura de la región C-terminal. La proteína en estudio, TRIM25, pertenece a la familia C-IV. En esta tabla se puede observar que la región N-terminal está formada por: el dominio RING (R), dominio B-box 1 (B1), dominio B-box 2 (B2) y dominio hélice superenrollada (CC), el extremo C-terminal es variable en este tipo de proteínas y puede estar presente uno o varios de los siguientes dominios: one signature (COS), fibronectina tipo III (FN3), dominio de interacción con proteínas (PRY-SPRY), homeodominio vegetal (PHD), bromodominio (BR), filamina tipo Ig (FIL), repeticiones NCL-1, HT2A y LIN-41 (NHL), dominios de homología del factor asociado al receptor de necrosis tumoral (MATH), dominios similares al factor de ribosilación de ADP (ARF), región transmembranal (TM). Tomada de Ozato, 2008.

Familia	Región N-terminal (motivo RBCC)	Región C-terminal	Miembros de la familia
C-I			MID1, MID2, TRIM9, TRIM36, TRIM46, TRIM67
C-II			TRIM54, TRIM55, TRIM63
C-III			TRIM42
C-IV			TRIM11, TRIM1, TRIM4, TRIM5α, TRIM6, TRIM7, TRIM10, TRIM11, TRIM15, TRIM17, TRIM21, TRIM22, TRIM25, TRIM26, TRIM27, TRIM34, TRIM35, TRIM38, TRIM39, TRIM41, TRIM43, TRIM47, TRIM48, TRIM49, TRIM50, TRIM53, TRIM58, TRIM60, TRIM62, TRIM64, TRIM65, TRIM68, TRIM69, TRIM72, TRIM75
C-V			PML, TRIM8, TRIM31, TRIM40, TRIM52, TRIM 56, TRIM 61, TRIM 73, TRIM 74
C-VI			TRIM24, TRIM28, TRIM33,
C-VII			TRIM2, TRIM3, TRIM32, TRIM71
C-VIII			TRIM37
C-IX			TRIM23
C-X			TRIM45
C-XI			TRIM13, TRIM59

**6.2.-Localización subcelular y modificaciones postraduccionales de las proteínas TRIM.** Las diferentes isoformas de las proteínas TRIM pueden ser susceptibles a otros tipos de modificaciones postraduccionales, incluidas la sumoilación, ISGilación y fosforilación. Se sabe que TRIM25 promueve la ISGilación de proteínas además de la poliubiquitinación ligada a lisina 63 (K63). ISG15 está implicada en respuestas inmunitarias innatas mediadas por interferón (IFN) de tipo I a través de la modulación de las vías de señalización de IFNAR (Receptor de IFN tipo I). Estos procesos pueden afectar notablemente los niveles de expresión de las proteínas y su localización subcelular.

La localización subcelular de TRIM varía entre los diferentes miembros de la familia. Por ejemplo, se sabe que TRIM5 se localiza en las estructuras citoplasmáticas designadas como cuerpos citoplásmicos mientras que TRIM19 se localiza en un dominio nuclear específico llamado cuerpos nucleares. Además, TRIM1/MID2, TRIM9 y TRIM18/MID1 están asociadas con microtúbulos y TRIM13 se localizó tanto en el retículo endoplásmico como en el núcleo (Kawai & Akira, 2011).

**6.3.-Proteínas TRIM: función bioquímica y participación en diversos procesos celulares.** La función de las proteínas TRIM es la catálisis del tercer paso en la cascada de ubiquitinación, actuando como ligasas E3, para modificar covalentemente sustratos proteicos con ubiquitina. El dominio RING lleva a cabo esta reacción uniendo la enzima conjugadora E2 cargada con Ub y colocando el resto de Ub en la orientación correcta. Tras la asociación del dominio RING y el conjugado E2Ub, una cisteína conservada en el E2 está preparada para la catálisis. La reacción normalmente da como resultado la formación de un enlace péptido entre el residuo de glicina C-terminal de Ub y un residuo de lisina en el sustrato, aunque pueden estar implicados otros residuos. Además, se ha demostrado que las proteínas TRIM se auto-ubiquitan como en el caso de TRIM5 $\alpha$  y TRIM25 (Williams et al., 2019).

Las proteínas TRIM tienen funciones en muchos procesos biológicos como la diferenciación celular, la autofagia, la apoptosis, la reparación del DNA y la supresión de tumores. Más de 20 miembros de esta familia han sido implicados en

las vías de señalización involucradas en la inmunidad innata, teniendo roles reguladores tanto positivos como negativos en la activación transcripcional del factor nuclear kappa-B (NF-κB) y los factores reguladores del interferón (IRFs)<sup>3/7</sup> requerido para la producción de citocinas e interferones antivirales. Algunas proteínas TRIM también pueden dirigirse a partículas virales directamente, como se ha demostrado para TRIM5α en respuesta a la infección por VIH (Van Gent et al., 2018; Williams et al., 2019). TRIM25 fue la primera proteína TRIM inmunomoduladora identificada; controla la actividad antiviral de RIG-I colocando en sus CARD poliubiquitina unida a K63.

También, se sabe que este grupo de proteínas son importantes moduladores de la autofagia, que es uno de los principales sistemas de degradación intracelular, además del sistema ubiquitina-proteasoma. La mayoría de los sustratos de la autofagia se reconocen de forma no selectiva y se incorporan al autofagosoma. Sin embargo, se ha encontrado que algunos autofagosomas reconocen selectivamente proteínas ubiquitinadas y orgánulos específicos como las mitocondrias. Algunas proteínas TRIM relacionadas con la autofagia afectan indirectamente a la inflamación y la activación de la inmunidad adquirida. Es probable que la autofagia suprima la carcinogénesis en la etapa de inicio, pero promueva la progresión del tumor en la etapa tardía. Por tanto, es difícil determinar si las proteínas TRIM relacionadas con la autofagia son factores oncogénicos u oncosupresores (Hatakeyama, 2017; Van Gent et al., 2018).

Varios miembros de la familia son cruciales en el desarrollo neuronal, con roles específicos en el crecimiento de neuritas, así como en la orientación y polarización de axones. Estos incluyen miembros de la subfamilia TRIM-NHL TRIM2, TRIM3 y TRIM32, así como TRIM9, TRIM46 y TRIM67 que contienen al dominio SPRY (Williams et al., 2019).

**6.4.-Proteínas TRIM en la carcinogénesis.** Los análisis patológicos de varios tipos de cáncer han demostrado que los niveles de expresión de las proteínas TRIM están estrechamente relacionados con el pronóstico. Por lo tanto, las proteínas TRIM pueden desempeñar funciones críticas en la transformación, la transición epitelio-

mesénquima y la metástasis, que son los factores más importantes en la malignidad de los cánceres (Hatakeyama, 2017). Se sabe que TRIM29 se sobre expresa en varios cánceres, incluidos el de esófago, mama, pulmón, vejiga, colorrectal y páncreas (Hatakeyama, 2017; Van Gent et al., 2018).

Muchos tipos de proteínas TRIM se han relacionado con enfermedades inflamatorias y cáncer. El aumento de la expresión de algunas TRIM se asocia con malignidad, por ejemplo, TRIM11, TRIM25, TRIM32 y TRIM66. Este trabajo se enfocará a TRIM25 en el contexto del cáncer de mama.

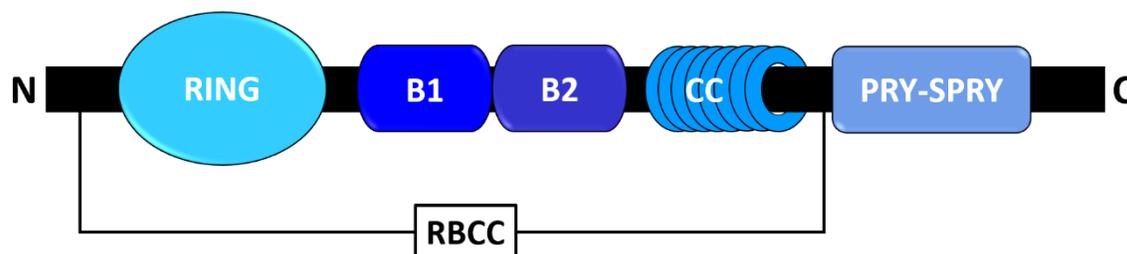
## 7.-Capítulo 2

### *Características de la proteína TRIM25*

#### 7.1.-Generalidades

TRIM25 pertenece a la familia de proteínas con motivo tripartito (TRIM) por lo que presenta una estructura conservada. Su extremo N-terminal está formado por la región RBCC que contiene los dominios: dominio dedos de zinc RING, dos dominios B-box (B1/B2) y un dominio en hélice superenrollada (CC) (**Fig. 2**) (Martín-Vicente et al., 2017). El dominio RING confiere a la proteína actividad de ligasa E3 de ubiquitina, ya que dirige la conjugación de ubiquitina a su proteína sustrato, al unirse a una enzima conjugadora de ubiquitina (E2). (Watanabe & Hatakeyama, 2017). Los dominios B-box regulan la unión a DNA y el dominio en hélice superenrollada es responsable de la dimerización de las ligasas TRIM25 además de unirse a RNA.

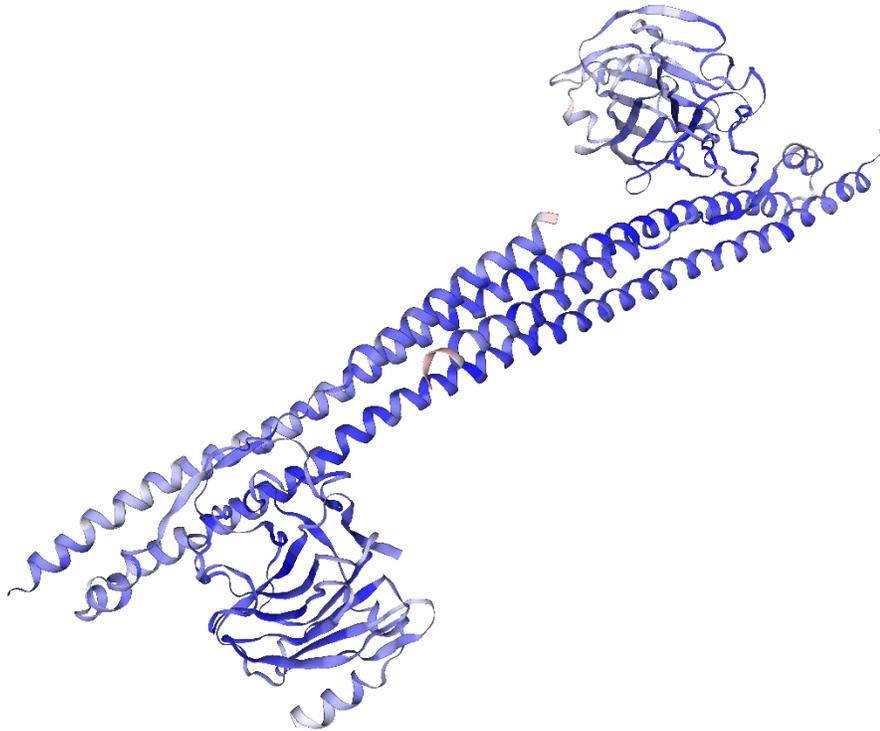
El extremo C-terminal de la proteína está formado por el dominio de fusión PRY-SPRY, también llamado dominio B30.2, que media las interacciones proteína-proteína, además tiene la capacidad de unirse a ácidos nucleicos como el RNA (Zhou & Costello, 2017).



**Figura 2.** Estructura de la proteína TRIM25. En extremo amino terminal se encuentra en dominio Really Interesting New Genen (RING) seguido de dos cajas B-box y un dominio en hélice superenrollada (CC). En el extremo carboxilo terminal se observa un dominio de interacción con proteína PRY-SPRY.

Además de tener actividad de enzima ligasa E3 para ubiquitina, TRIM25 también es una ligasa E3 para la proteína ISG15 en el sistema de ISGilación. Se sabe que la

proteína TRIM25 tiene capacidad de auto-ubiquitinación lo que le permite modificarse a sí misma. TRIM25 además de ser un regulador postraduccional también participa en la regulación postranscripcional uniéndose al RNA través de su región en hélice superenrollada, pues se ha observado que la eliminación de la parte media de ese dominio le impide a TRIM25 unirse al RNA, aunque los mecanismos de interacción no se conocen completamente (Kwon et al., 2013).



**Figura 3.** Estructura cristalina de los dominios hélice superenrollada y PRY-SPRY de la proteína TRIM25 humana. Difracción de rayos X, 3.60 Å. Tomado de SWISS-MODEL.

Existen varios procesos celulares en los que participa TRIM25, por ejemplo, regula la acción de varios supresores de tumores tal es el caso de p53 y 14-3-3 $\sigma$ , ambos con actividad supresora de tumores (Qin et al., 2015). En los siguientes capítulos, se presentan las funciones de TRIM25 en el sistema de ubiquitinación e ISGilación y sus implicaciones en cáncer de mama.

## **8.-Capítulo 3**

### ***ISG15 como una proteína parecida a la ubiquitina que está implicada en cáncer de mama***

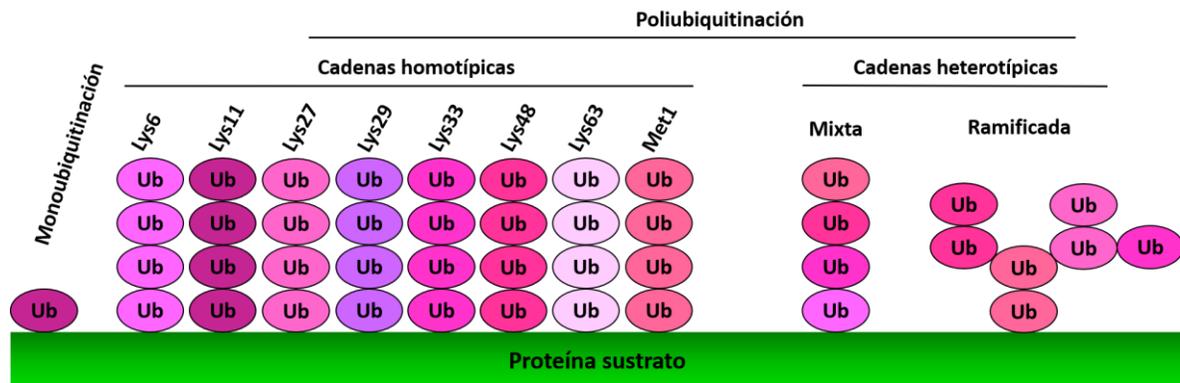
La actividad enzimática como E3-ligasa de TRIM25 le permite participar en los procesos de ubiquitinación e ISGilación. Tanto la ubiquitinación como la ISGilación regulan modificaciones postraduccionales de proteínas mediante la formación de un enlace covalente, entre las proteínas diana con la ubiquitina o ISG15, respectivamente. Si bien la ubiquitina y ISG15 comparte características estructurales, las vías en las que participan son diferentes (Narasimhan et al., 2005).

#### **8.1.- La ubiquitina y la ubiquitinación**

La ubiquitina (Ub) es una proteína con un peso de 8 kDa, compuesta por 76 aminoácidos entre los que se encuentran siete residuos de lisina (K6, K11, K27, K29, K33, K48 y K63), en su extremo C-terminal se encuentra el motivo con la secuencia Leucina-Arginina-Leucina-Arginina-Glicina-Glicina (LRLRGG), encargado de la formación de un enlace peptídico entre la glicina presente en este motivo y un residuo de lisina presente en la proteína blanco u otra ubiquitina (Hatakeyama, 2017; Kuslansky et al., 2016). La ubiquitina está implicada en dos procesos, la monoubiquitinación y la poliubiquitinación. Generalmente la monoubiquitinación regula procesos como la reparación del DNA, la expresión génica, la endocitosis y la estabilidad de proteínas. Mientras que la poliubiquitinación es un marcador de degradación a través del proteasoma. A este proceso se le denomina sistema ubiquitina-proteasoma o UPS (Kuslansky et al., 2016). El UPS regula varios procesos celulares -por ejemplo- el ciclo celular en el cáncer de mama, al modular la expresión de ciclinas y cinasas dependientes de ciclina (CDK). Las funciones celulares de las ciclinas y las CDK están directamente relacionadas con las características clínicas del cáncer de mama (Ohta & Fukuda, 2004).

En la monoubiquitinación, una sola molécula de ubiquitina se une al sustrato, mientras que la unión de varias moléculas de ubiquitina a varios residuos de lisina

del sustrato se le llama multi-monoubiquitinación (Swatek & Komander, 2016). La poliubiquitinación se lleva a cabo a través de los residuos de lisina 6,11,27,29,33,48, y 63 presentes en la ubiquitina (**Fig.4**). La ubiquitinación puede ocurrir secuencialmente en cualquiera de los residuos de lisina de la proteína blanco. Además, gracias a los diferentes residuos de lisina presentes en la ubiquitina, esta proteína es capaz de formar cadenas de distintos tipos dependiendo de los residuos de lisina que se estén uniendo. Los tipos de cadenas que se pueden formar son: cadenas homotípicas y cadenas heterotípicas. Las cadenas homotípicas están formadas por ubiquitinas unidas por el mismo aminoácido. En las cadenas heterotípicas existen diferentes sitios de enlaces, formando cadenas mixtas o cadenas ramificadas (Sadowski et al., 2012; Swatek & Komander, 2016).

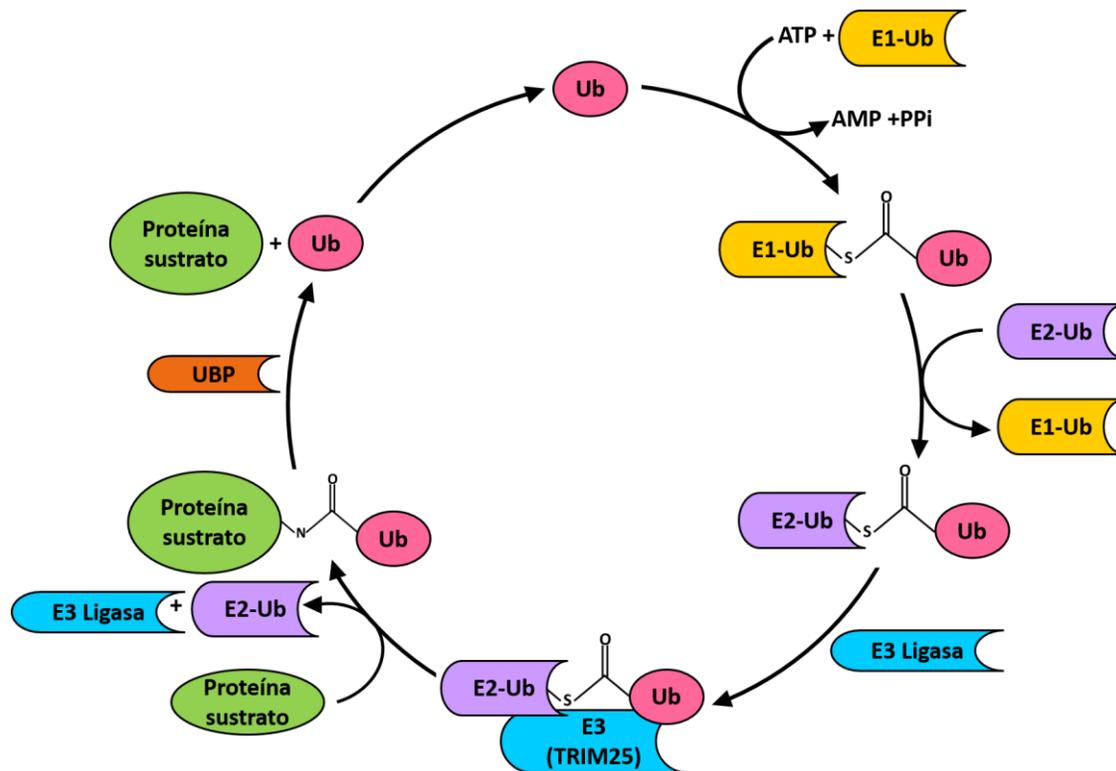


**Figura 4.** Diferentes tipos de ubiquitinación que puede presentar una proteína. Ubiquitina (Ub), lisina (Lys), metionina (Met).

La función de la poliubiquitinación está relacionada con el número de lisina en el que se forma la cadena de ubiquitinas, por ejemplo: la poliubiquitinación ligada a K48 es reconocida como una señal de direccionamiento que permite que las proteínas modificadas sufran una degradación dependiente del UPS. La poliubiquitinación ligada a K63 está involucrada en las vías de transducción de señales y el tráfico de proteínas blanco, mientras que la poliubiquitinación ligada a K27 es una modificación involucrada en la inmunidad antiviral (Hatakeyama, 2017).

La ubiquitinación es un proceso en el que participan de manera coordinada 3 tipos de enzimas: 1) enzimas activadoras E1-Ub, 2) enzimas conjugadoras E2-Ub y 3)

enzimas ligasas E3-Ub (**Fig. 5**). En este proceso la ubiquitina es activada por la enzima E1-Ub que tiene dos dominios conservados de unión a ATP y residuos de cisteínas en el sitio activo, necesarios para la activación. Una vez que la ubiquitina está activada se transfiere a una cisteína presente en el sitio activo de la enzima E2-Ub. Finalmente, la ubiquitina es transferida, con la ayuda de la enzima E3-Ub, al grupo amino de alguna lisina presente en la proteína sustrato (Zhang & Zhang, 2011).



**Figura 5.** Cascada de ubiquitinación en la que TRIM25 actúa como enzima ligasa de ubiquitina E3. En este proceso la enzima activadora de Ub E1 (E1-Ub) se une al adenosín trifosfato (ATP) para formar un enlace tioéster con la ubiquitina, en este proceso se libera adenosín monofosfato (AMP) y priofosfato (PPI), posteriormente la enzima de conjugación de Ub (E2-Ub) transfiere la Ub a su sitio activo donde se forma otro enlace tioéster, finalmente con la ayuda de TRIM25, la ubiquitina es transferida al sustrato. Existe un grupo de proteínas desubiquitinantes (UBP) que pueden revertir la ubiquitinación. Modificada de Williams et al., 2019.

Las enzimas ligasas E3-Ub son de gran importancia para determinar la especificidad del sustrato, además, regulan varios procesos celulares como el metabolismo, la homeostasis, el ciclo celular, la estabilidad de sustratos, así como las actividades oncogénicas y supresoras de tumores. Estas proteínas pueden desregularse durante la carcinogénesis a causa de alteraciones en los mecanismos postraduccionales, lo que afecta la inducción, progresión y resistencia a la terapia antitumoral (Prebys, 2017). Se han identificado más de 600 ligasas E3-Ub, y un ejemplo de ellas importante en cáncer de mama es BRCA1, la cual es uno de los marcadores clínicos de cáncer de mama más conocidos, una de las diversas funciones de este marcador es mediar la poliubiquitinación ligada a Lys-6, además, está implicado en la reparación del daño en DNA (Ohta & Fukuda, 2004). El otro ejemplo que es el punto central de este trabajo es TRIM25, la cual por su actividad de E3-ligasa de Ub, es capaz de interactuar con varias proteínas, conduciéndolas a su degradación vía ubiquitinación (Sadowski et al., 2012).

Principalmente, las enzimas E3-Ub se divide en dos grupos: 1) Moléculas que contienen dominios homólogos a E6AP en el extremo carboxi-terminal (HECT) y 2) Ligasas E3 no HECT. Las ligasas E3 no HECT contienen un dominio RING o dominios estructuralmente parecidos a este, como el dominio de la caja U (Zhang & Zhang, 2011). Las HECT forman un aducto tioéster con la Ub antes de que esta proteína se una covalentemente con la proteína sustrato. Las proteínas no HECT funcionan como elementos de acoplamiento, juntando a las enzimas E2-Ub con el sustrato para la transferencia de ubiquitina (Zhang & Zhang, 2011).

El proceso de ubiquitinación puede ser reversible y es facilitado por proteínas desconjugantes de ubiquitina (Dubs) que ayudan con el reciclaje de ubiquitinas, en humanos se expresan aproximadamente 100 de estas enzimas (Zhang & Zhang, 2011). Durante la progresión del cáncer es importante estudiar el proceso de ubiquitinación, así como a las enzimas que participan en el, ya que están relacionados con la degradación proteasomal, la abundancia, la localización y la actividad e interacción de proteínas (Popovic et al., 2014).

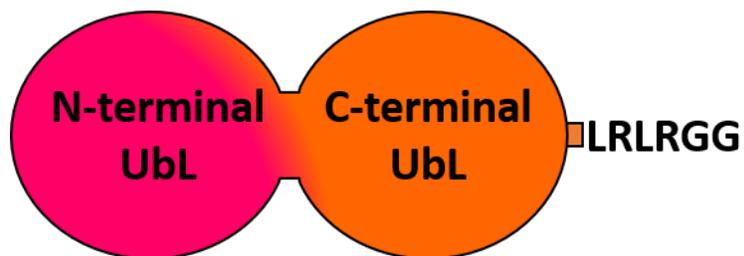
## 8.2.-El gen y la proteína ISG15

El gen 15 estimulado por interferón (*ISG15*) se describió por primera vez en 1979 como un gen que codifica una proteína de ~15 kDa. ISG15 fue traducida *in vitro* a partir del RNA de células tumorales murinas estimuladas por interferones tipo-1 (IFN-I) (Tecalco et al., 2020; Zhang & Zhang, 2011). ISG15 es un miembro de las proteínas parecidas a la Ub, pero una diferencia entre la Ub e ISG15, consiste en su regulación a nivel transcripcional, debido a que diversos estímulos pueden inducir la expresión de ISG15 dependiendo del entorno celular, por ejemplo, los IFN tipo I y II inducen la expresión del gen *ISG15*. Se sabe que el promotor del gen *ISG15* contiene dos elementos de respuesta al estímulo de los IFNs (ISRE), siendo STAT1 y STAT2 dos factores de transcripción que se unen a estos sitios. Es por ello que *ISG15* es un gen regulado por de la vía de señalización JAK-STAT. IFN tipo III emplea la misma vía de señalización que IFN tipo I por lo que también activa la producción de ISG15, pero la inducción de ISG15 es menor por IFN-III que por IFN-I. Los factores de respuesta al IFNs (IRF) reconocen secuencias de respuesta similares al ISRE por lo que también podrían activar la respuesta de ISG15 (Zhang & Zhang, 2011).

El IFN- $\gamma$  también se ha implicado en la inducción de ISG15 durante el cáncer de mama, pero no se conocen los mecanismos implicados. IFN- $\gamma$  induce cambios en la morfología de células con cáncer de mama junto con un incremento en los niveles de proteína ISG15 libre y las marcas de ISGilación en proteínas (Cruz-Ramos et al., 2019; Tecalco-Cruz et al., 2019). La expresión de *ISG15* también está regulada por PU.1, un factor de transcripción de la familia Ets. PU.1 es específico de células B y células mieloides, además, es de gran importancia en la diferenciación y función de las células sanguíneas. El sitio de unión para PU.1 en el promotor de gen ISG15 se traslapa como la secuencia ISRE. PU.1 con IRF4 o IRF8 inducen sinérgicamente la expresión de ISG15. Esto indica que PU.1 contribuyen a una mayor expresión de ISG15 y mayor ISGilación de proteínas en células mieloides y hematopoyéticas (Zhang & Zhang, 2011). Existen otros factores, tanto externos como internos, que pueden desencadenar la expresión de ISG15. Entre las agresiones externas se

encuentran la radiación gamma, los anticancerígenos o infecciones virales, las agresiones internas pueden ser las enfermedades y el envejecimiento (Zhang & Zhang, 2011).

La proteína ISG15 es un péptido de 156 aa con peso de 15 kDa y está formada por dos dominios similares a la ubiquitina unidos por una región linker o de unión, cada dominio está conformado por 5 hojas- $\beta$  plegadas y una hélice- $\alpha$ . La forma madura de ISG15 carece de metionina N-terminal y su extremo C-terminal contiene la misma secuencia de 6 aminoácidos (LRLRGG) que contiene la ubiquitina. Se estima que los dominios N-terminal y C-terminal de ISG15 comparten alrededor de 33% y 32% de similitud con la ubiquitina, respectivamente (**Fig. 6**). Además, sus estructuras tridimensionales son similares. ISG15 se ha encontrado en varios mamíferos como humanos, monos, pandas, caballos, vacas, ovejas, cerdos, perros, gatos, conejos, ratas, ratones y zarigüeyas. Su conservación en especies es relativamente baja, varía desde un 98% (de chimpancé a humano) a un mínimo de 42% (zarigüeya a humano) y solo se ha identificado en vertebrados (Zhang & Zhang, 2011).

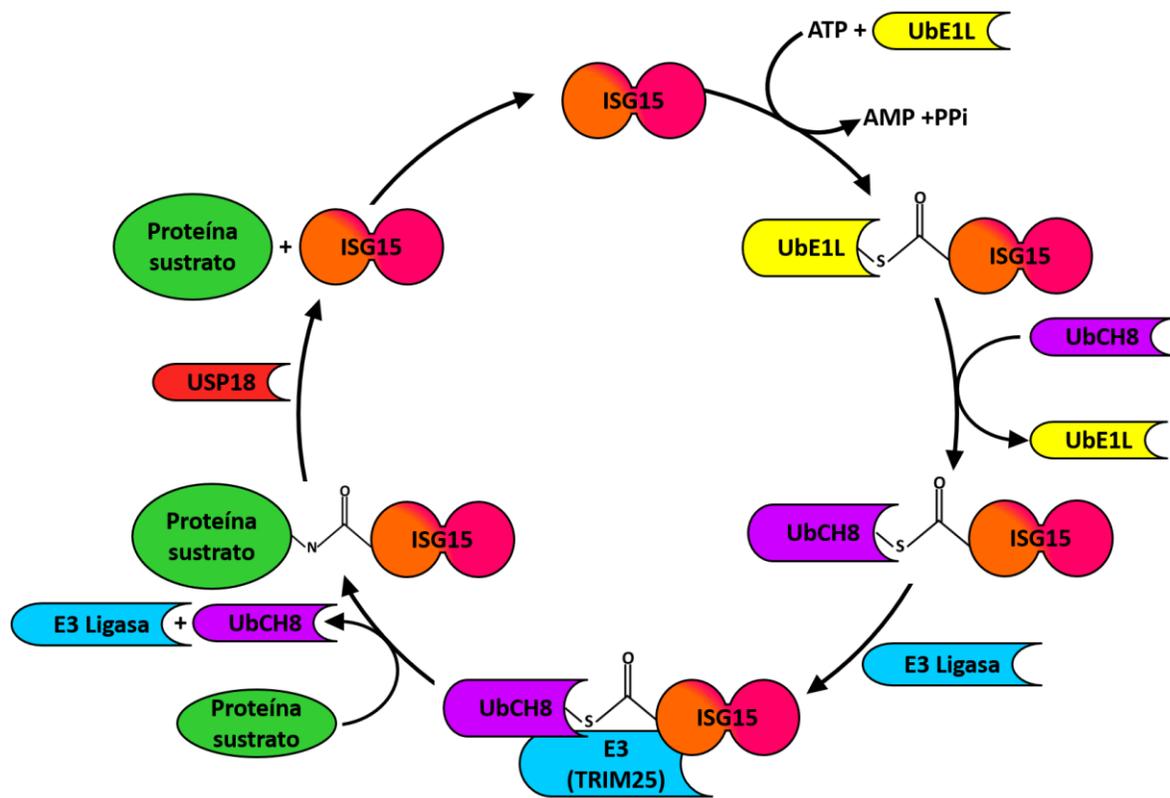


**Figura 6.** Proteínas ISG15. Esta proteína está formada por dos dominios tipo ubiquitina (UbL) y una región de unión, el extremo c-terminal de este péptido contiene el mismo motivo: Leucina-Arginina-Leucina-Arginina-Glicina-Glicina (LRLRGG) que contiene la ubiquitina.

### 8.3.-ISGilación de proteínas

La función primaria de ISG15 es su capacidad de modificar a las proteínas postraduccionalmente a través de un proceso catalítico similar a la ubiquitinación, que en este caso es denominado como ISGilación. La ubiquitinación y la ISGilación

comparte algunas enzimas primarias, entre ellas se encuentra la ligasa TRIM25 (**Fig.7**). En la ISGilación participa un conjunto de proteínas análogas a las que participan en la ubiquitinación, algunas de ellas son: la enzima UbE1L (también conocida como UbA7) encargada de la activación, la enzima UbCH8, también implicada en la ubiquitinación, que actúa como una proteína de conjugación E2-Ub y las enzimas TRIM25/EFP, HERC5 y HHARI con actividad ligasa E3 (Zhang & Zhang, 2011). En este proceso la enzima E1 cataliza la formación de un enlace tioéster con la glicina C-terminal de ISG15, de una manera dependiente de ATP, posteriormente, mediante transesterificación, ISG15 se une a la enzima conjugadora E2, por último, una ligasa E3 transfiere a ISG15 de la enzima E2 a algún residuo de lisina de la proteína diana (Malakhov et al., 2003; Tecalco et al., 2020).



**Figura 7.** Proceso de ISGilación. En esta reacción participan proteínas análogas a las que participan en la ubiquitinación, de hecho, comparten algunas proteínas como la proteína TRIM25. La enzima activadora E1 tipo Ub (UbE1L) forma un enlace

tioéster con el extremo C-terminal de ISG15, posteriormente ISG15 se trasfiere a la enzima de conjugación UbCH8. Con la ayuda de TRIM25 el extremo C-terminal de ISG15 se conjuga con el grupo amino de la lisina presente en el sustrato. La proteasa USP18 elimina la interacción de ISG15 con el sustrato. Modificada de Zhang & Zhang, 2011.

De manera interesante, los IFNs no estimulan solamente a ISG15, también estimulan a las enzimas que participan en la ISGilación en algunos contextos celulares. Por ejemplo, el promotor del gen que codifica para la enzima UbCH8 tiene sitios de unión para ISRE y PU.1, por lo que también es regulada por IFNs.

A la fecha se han identificado pocas proteínas modificadas por ISGilación y se conoce poco sobre las enzimas ligasa E3 para ISG15. Por ejemplo, HHARI cataliza la ISGilación específica de 4EHP. Sin embargo, HERC5 produce una ISGilación robusta independiente de la presencia de IFNs (Zhang & Zhang, 2011). En contraste al proceso de ISGilación, el proceso para eliminar ISG15 de sus proteínas conjugadas se denomina des-ISGilación, y el objetivo de este proceso es generar la forma libre de ISG15 conocida como "ISG15 libre" (Basters et al., 2014). En la desconjugación de ISG15 participa la enzima USP18 también llamada UBP43, la cual es una proteína con peso molecular de 43kDa. La estructura de USP18 posee cajas de cisteína y de histidina que están altamente conservadas y son características de la familia de proteasas UBP. Como las regiones C-terminales de ISG15 y de ubiquitina son bastante similares, USP18 también está implicada en el proceso de desubiquitinación. Se sabe que las células deficientes de USP18 son altamente sensibles a IFN y lipopolisacárido LPS (Tecalco et al., 2020; Zhang & Zhang, 2011).

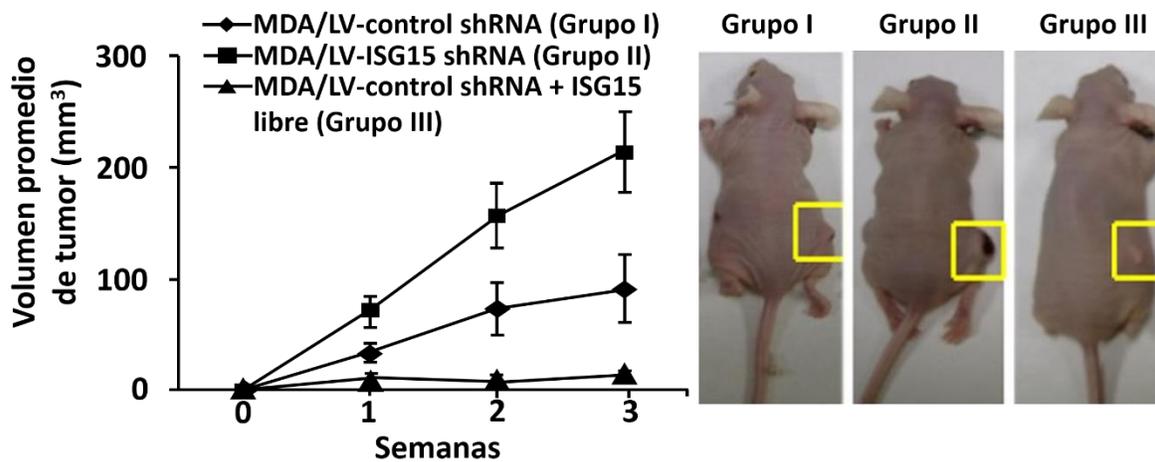
Se sabe que en varios tipos de tumores primarios como el de vejiga, próstata, oral y de mama, existen niveles altos de ISG15 y de proteínas ISGiladas, y es posible que este aumento se desencadene por una mayor liberación de IFN (Zhang & Zhang, 2011).

#### **8.4.- ISG15 libre y la ISGilación de proteínas en cáncer de mama**

Los niveles de ISG15 libre y de proteínas ISGiladas son específicos en cada tipo de célula (Tecalco et al., 2020). La distribución subcelular de ISG15 se reporta principalmente en el citoplasma, en seguida, en el núcleo, las mitocondrias, la membrana plasmática y el citoesqueleto. En células con cáncer de mama se encuentra principalmente en el citoplasma y en el núcleo celular (Tecalco et al., 2020). Se ha observado que los niveles de mRNA para ISG15 y de proteína ISG15 se regulan positivamente en carcinoma mamario en comparación con tejido mamario normal. Esto indica que la sobreexpresión de ISG15 se correlaciona con un pronóstico desfavorable para el cáncer de mama. Los niveles más altos de mRNA del gen *ISG15* se han detectado en tumores de grado 3, lo que indica que su expresión puede estar asociada con la progresión de tumores mamarios (Tecalco-cruz et al., 2019). Se sabe que el IFN- $\gamma$  es quien aumenta los niveles de mRNA de ISG15 en células de cáncer de mama MDA-MB-231 y en células MCF-7. Además, las células de cáncer mamario ER $\alpha$ + y ER $\alpha$ - tienen un perfil de ISGilación específico (Tecalco et al., 2020). Las células de cáncer de mama MCF-7 ER $\alpha$ + tienen niveles altos de proteína ISG15 libre en comparación con otros tipos de células. Otros estudios han mostrado que las células con cáncer de mama triple negativo (ER $\alpha$ -, PR-, HER2-) tiene niveles bajos de proteína ISG15 libre. Esto sugiere que las proteínas ISGiladas en el cáncer de mama ER $\alpha$ + no son las mismas que están ISGiladas en ER $\alpha$ - (Tecalco et al., 2020).

La relevancia de la ISGilación de proteínas en células de cáncer de mama se demostró a través de experimentos utilizando RNA de interferencia para reducir la expresión de ISG15 o UbCH8. Como resultado se observó una reducción en la proliferación, migración y transición epitelial mesenquimal en células de cáncer de mama MDA-MB-231. Por lo tanto, la expresión de ISG15 y UbCH8 tienen un papel pro-tumoral pues contribuyen en el aumento de la migración de células mamarias (J. Burks et al., 2014; Desai et al., 2012). En contraste, los estudios *in vivo* indican que ISG15 tiene una función antitumoral. Esto debido a que un grupo de ratones atímicos a los que se realizó un trasplante de células de cáncer de mama MDA-MB-

231 con silenciamiento de ISG15, mostró un aumento en el desarrollo tumoral y un menor reclutamiento de células NK, en comparación al grupo control. Estos resultados indican que la expresión de *ISG15* es importante en el control del crecimiento tumoral en el modelo de estudio. En el mismo estudio, al inyectar ISG15 libre recombinante en los ratones atímicos, cerca del trasplante de células MDA MB-231, se observó una disminución del crecimiento tumoral, un aumento en la infiltración de células NK y una mayor expresión superficial del complejo principal de histocompatibilidad (MHCII) (**Fig. 8**) (Julian Burks et al., 2015). De esta forma, ISG15 libre extracelular podría tener funciones anti-tumor.



**Figura 8.** A) Se muestra el crecimiento tumoral, desde el día del implante hasta la tercera semana, en cada uno de los grupos. B) Se observan las fotografías representativas de ratones portadores de tumores, después de tres semanas, de cada uno de los grupos en estudio. Se pusieron xenoinjertos de células de cáncer de mama con el vector para shRNA como control (MDA/LV-control shRNA) (Grupo I, grupo III) y células de cáncer de mama con shRNA para ISG15 (MDA/LV-ISG15 shRNA) (Grupo II) en ratones desnudos hembras. El mismo día se inyectó ISG15 libre recombinante (188µg) cerca del sitio de implantación del xenoinjerto en el grupo III. El volumen se midió de 0 a 3 semanas después de la implantación. Cada punto representa el volumen promedio (+/- SEM) (P=0.033). Tomada de Burks et al., 2015.

## 8.5.-Vías de señalización asociadas a ISG15 en cáncer de mama

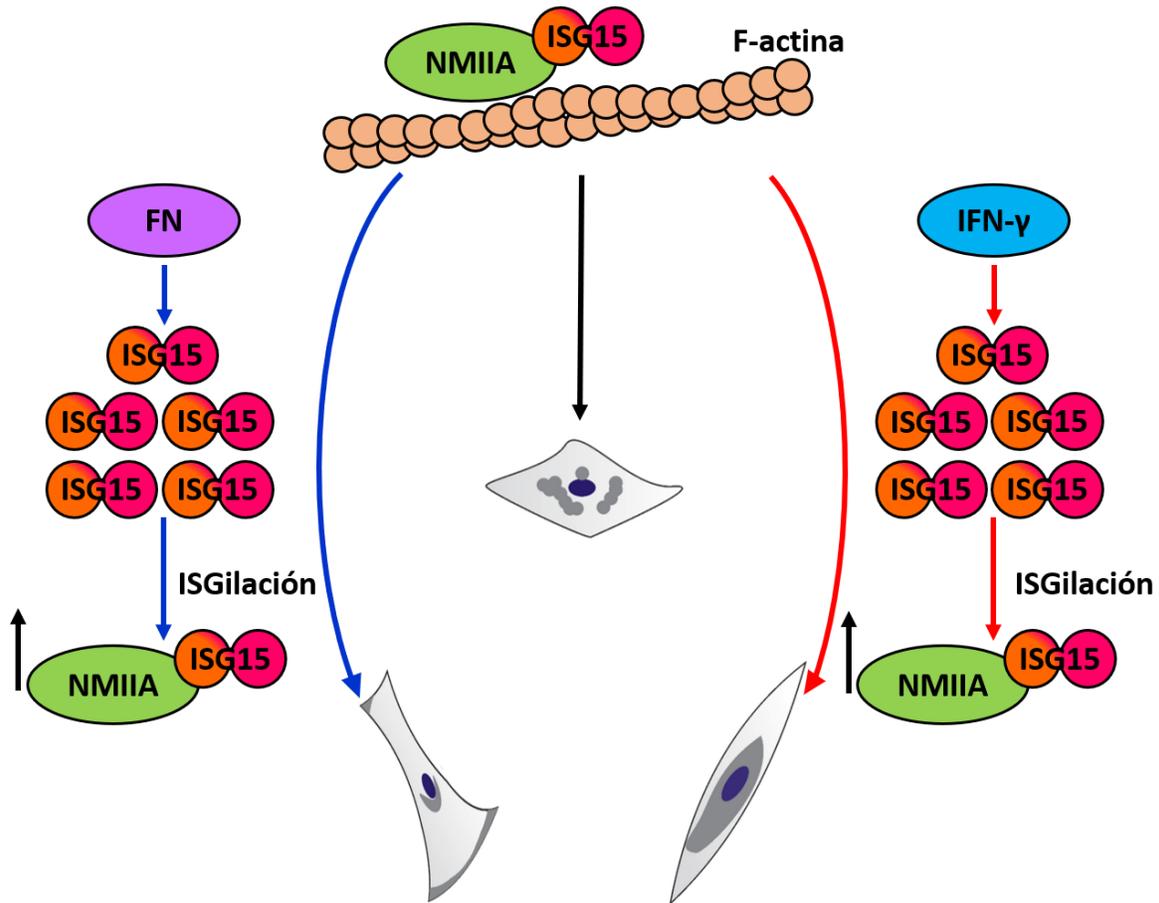
Sin embargo, se ha observado que cuando se elimina ISG15 o UbCH8 de células ZR-75-1 de cáncer de mama disminuye la sensibilidad a las camptotecinas. Incluso en varias líneas de células tumorales resistentes a las camptotecinas, los niveles de ISG15 son bajos (Zhang & Zhang, 2011). Además, se sabe que la regulación positiva de ISG15, inducida por IFN durante quimioterapia para cáncer de mama, se correlaciona con un aumento en los niveles de fosforilación de STAT1, con el daño al DNA y la apoptosis. Esto sugiere que las células que responden a los IFN, expresando genes como *ISG15*, son sensibles al daño del DNA y en consecuencia responden a la quimioterapia (Legrier et al., 2016).

Se ha observado que la vía del IFN- $\gamma$  aumenta la sensibilidad al tamoxifeno y restaura la sensibilidad al fulvestrant en las líneas celulares del cáncer de mama. Esto indica que los genes inducidos con IFN- $\gamma$ , incluido *ISG15*, podrían afectar la respuesta a la terapia endocrina con tamoxifeno o fulvestrant (Tecalco et al., 2020).

Existen dos proteínas citoplasmáticas, llamadas miosina no muscular IIA (NMIIA) y la proteína activadora de GTPasa 1 (IQGAP1), que están implicadas en la reorganización citoesquelética e interactúan con ISG15 en este proceso. Se ha identificado que en cáncer de mama hay mayor ISGilación de estas proteínas debido a la presencia de IFN- $\gamma$  (Cerikan & Schiebel, 2016; Cruz-Ramos et al., 2019). NMIIA es una proteína de 230 kDa asociada con los filamentos de actina para generar el complejo de actomiosina implicado en la remodelación citoesquelética y en la propagación celular que ayudan a la motilidad de las células. Durante la propagación de las células MDA-MB-231, inducida por el sustrato de fibronectina (FN), las proteínas NMIIA e ISG15 se localiza en la región laminar y en el citoplasma de estas células, lo que sugiere que la ISGilación de NMIIA es importante en este proceso. Cabe decir que la fibronectina puede inducir la expresión de *ISG15* y la ISGilación de proteínas a través de la señalización dependiente de integrinas en células de cáncer de mama (Cruz-Ramos et al., 2019).

La presencia de IFN- $\gamma$  aumenta la ISGilación de NMIIA lo que genera cambios en la morfología de las células de cáncer de mama con la formación de fibras de estrés

(Fig.9) (Tecalco et al., 2020). Estos datos sugieren que la vía del IFN- $\gamma$  puede activar la ISGilación de proteínas implicadas en la reorganización citoesquelética, un evento importante en la invasión y progresión del cáncer.



**Figura 9.** La ISGilación de la proteína miosina no muscular IIA (NMIIA) puede modular el complejo de actomiosina, que afecta la reorganización del citoesqueleto y consecuentemente la morfología de las células. La ISGilación de NMIIA puede ser desencadenada por la presencia de moléculas como la fibronectina (FN) o el interferón gama (IFN- $\gamma$ ). Modificada de Cruz-Ramos et al., 2019.

Respecto a las vías de señalización asociadas a ISG15 en cáncer de mama, existe una vía de proteínas G monoméricas llamadas Ki-Ras implicadas en la regulación

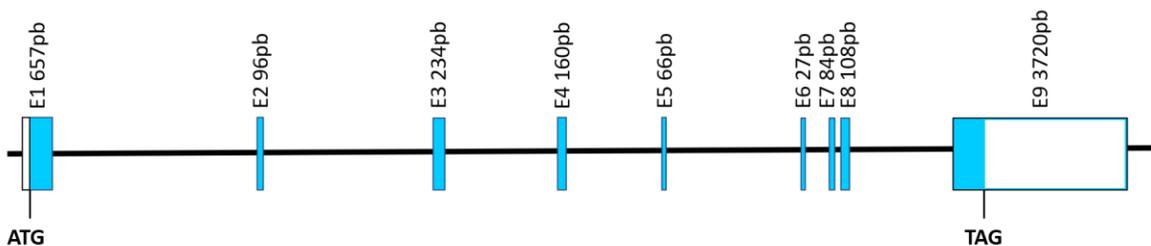
de ISG15 y el sistema de ISGilación. Se ha demostrado que la reducción de la expresión de Ki-Ras, mediante RNA interferente, en las células de cáncer de mama MDA-MB-231, ZR-75-1 y MCF-7 provoca una disminución de los niveles de ISG15 libre y de la ISGilación de proteínas. En el cáncer de mama existe una relación positiva entre la expresión de *ISG15* y *KSRI* (supresor de cinasas de Ras 1) (Tecalco et al., 2020). Otras vías asociadas a ISG15 en algunos tumores mamarios malignos son las vías p53 y del factor de ribosilación de ADP (ARF). En el cáncer de mama triple negativo los niveles de p53 y ARF son bajos y están correlacionados con niveles altos de STAT1 e ISG15, promoviendo proliferación celular (Tecalco et al., 2020).

Esta información es relevante, considerando que algunos blancos de ISGilación podrían ser dependientes de la actividad de TRIM25, y en consecuencia la desregulación de la expresión de TRIM25 en cáncer, podría afectar el perfil de ISGilación; no obstante, más estudios son requeridos al respecto.

## 9.-Capítulo 4

### *Regulación de la expresión de TRIM25 en cáncer de mama*

El gen *TRIM25* que se encuentra en el cromosoma humano 17q22; este gen mide alrededor de 25kb de DNA y está organizado en nueve exones (**Fig.10**) (Ikeda et al., 2000; Martín-Vicente et al., 2017).



**Figura 10.** Organización genómica del gen *TRIM25* humano, los exones se muestran en azul. También se muestran los tamaños de los exones (E), a partir de codón de inicio ATG hasta el codón de paro TAG. Modificada de Ikeda et al., 2000.

Se ha observado que en cáncer de mama, ovario, pulmón y cáncer gástrico existe una elevada expresión de *TRIM25*, donde promueve la proliferación, migración e invasión de células tumorales (Zhou & Costello, 2017). Además, en cáncer de mama metastásico se ha reportado un incremento significativo de la expresión de *TRIM25* en comparación a tumores mamarios primarios (Walsh et al., 2017).

*TRIM25* es un gen inducido por los interferones a nivel transcripcional en distintos tipos de células, aunque los mecanismos moleculares implicados no se han investigado. Otro hecho importante relacionado con la regulación de la expresión del gen *TRIM25* es que el tratamiento con estrógenos incrementa los niveles de mRNA y de la proteína TRIM 25, por ello es que a esta proteína también se le conoce como EFP (Proteína de dedo sensible a estrógeno). Por lo tanto, *TRIM25* es un gen regulado por estrógenos en células sensibles a esta hormona, entre ellas, las células que conforman el tejido mamario (Urano et al., 2002). El mecanismo molecular implicado en la modulación de TRIM25 por los estrógenos está asociado

con la presencia de una secuencia enhancer o potenciadora localizada en el extremo final del 3'UTR del gen *TRIM25*. Dentro de esta secuencia enhancer se encuentra un elemento de respuesta a estrógenos (ERE) (Ikeda et al., 2000).

Los enhancers son segmentos de DNA que generalmente tienen pocos cientos de pares de bases de longitud y pueden reclutar proteínas para aumentar la probabilidad de transcripción de genes particulares. Los enhancers están a una distancia considerable de hasta 1Mb de los demás elementos reguladores como los promotores, sin embargo, el plegamiento del genoma ayuda a que estén cerca en el espacio tridimensional. Las actividades de los enhancers son esenciales para la transcripción coordinada dentro de una célula. Al igual que otros elementos reguladores de la transcripción tiene un papel clave en diversos procesos biológicos como el desarrollo, la homeostasis celular y tisular, las respuestas a estímulos externos, la especialización de tipo celular y en la enfermedad (Andersson & Sandelin, 2020; Mao et al., 2018).

Por otra parte, la presencia de ERE en la región regulatoria 3'UTR de *TRIM25* sugiere que se trata de una región modulada por la vía de los estrógenos. Los estrógenos son hormonas esteroideas sexuales implicadas en el crecimiento de la glándula mamaria y el endometrio uterino durante el embarazo, además, regula el ciclo menstrual. En el tejido mamario la síntesis de estrógenos está mediada por las enzimas aromatasa a partir de testosterona. Una exposición prolongada a estrógenos, el inicio temprano de la menstruación, la menopausia tardía y/o la terapia con estrógenos pueden ser factores de riesgo en el desarrollo de cáncer de mamá y útero, pues esta hormona participa en la progresión del ciclo celular (Horie et al., 2003; Ikeda & Inoue, 2004).

Los estrógenos tienen un papel muy importante en la proliferación de células cancerosas en órganos reproductores femeninos, esta actividad está mediada por receptores ER $\alpha$  y ER $\beta$ , estos elementos son factores de transcripción dependientes de ligando. Se ha encontrado que gran parte de la población que presenta tumores mamarios tiene una expresión elevada de receptores de estrógenos. El ER $\alpha$  y ER $\beta$  pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares por lo que comparten

estructuras y modos de acción similares. Estos ERs unidos a estrógenos se pueden unir como homodímeros o como heterodímeros al ERE por medio de su dominio de unión a DNA y regulan la transcripción de los genes diana (Ikeda & Inoue, 2004).

Se ha encontrado que la respuesta a estrógenos se ve disminuida en el útero de ratones knockout de TRIM25; esto sugiere que TRIM25 es esencial en el crecimiento celular inducido por estrógenos, mediando algunas actividades de los estrógenos en órganos diana como el útero y las glándulas mamarias (Ikeda et al., 2000). De este modo la presencia de los estrógenos, particularmente del estradiol, favorece la actividad del enhancer de TRIM25 promoviendo su expresión en células de cáncer de mama (Ikeda et al., 2000).

La expresión de *TRIM25* también puede ser modulada por microRNAs (miRNAs) y proteínas de unión a RNA. Los miRNAs son una clase de RNA pequeños no codificantes, su estructura monocatenaria tiene de 21 a 23 nucleótidos de longitud, están altamente conservados y controlan la expresión de otros RNA como los mRNA, RNA no codificantes y los mismos miRNA. Los miRNA afectan la expresión génica al silenciar los mRNA, pueden inhibir la traducción o promover la degradación del mRNA. Una de las principales labores de los miRNA es regular la expresión génica a nivel postranscripcional al actuar sobre mRNA uniéndose a su región no traducida tres prima (3'UTR). Un solo mRNA puede ser objeto de varios miRNA pero un solo miRNA puede dirigirse a cientos de mRNA lo que les permite regular redes completas de proteínas (de Sousa et al., 2019; Hill & Tran, 2021).

Alrededor del 30% de genes que codifican proteínas en humanos están regulados por miRNAs y 3% de los genes humanos codifican para miRNA (Tiwari et al., 2017). Existen dos tipos de miRNA, los miRNA que provienen de regiones no codificantes entre genes y son transcritos por promotores no identificados reciben el nombre de miRNA intergénicos y los que se generan a partir de intrones no codificantes o de los extremos 5'UTR y 3'UTR de los genes del hospedero llamados miRNA intrínicoso o intragénicos (Wang et al., 2019).

Casi todos los eucariontes expresan cientos de miRNA y son específicos de cada tejido. Para mantener un entorno fisiológico equilibrado es necesario mantener una

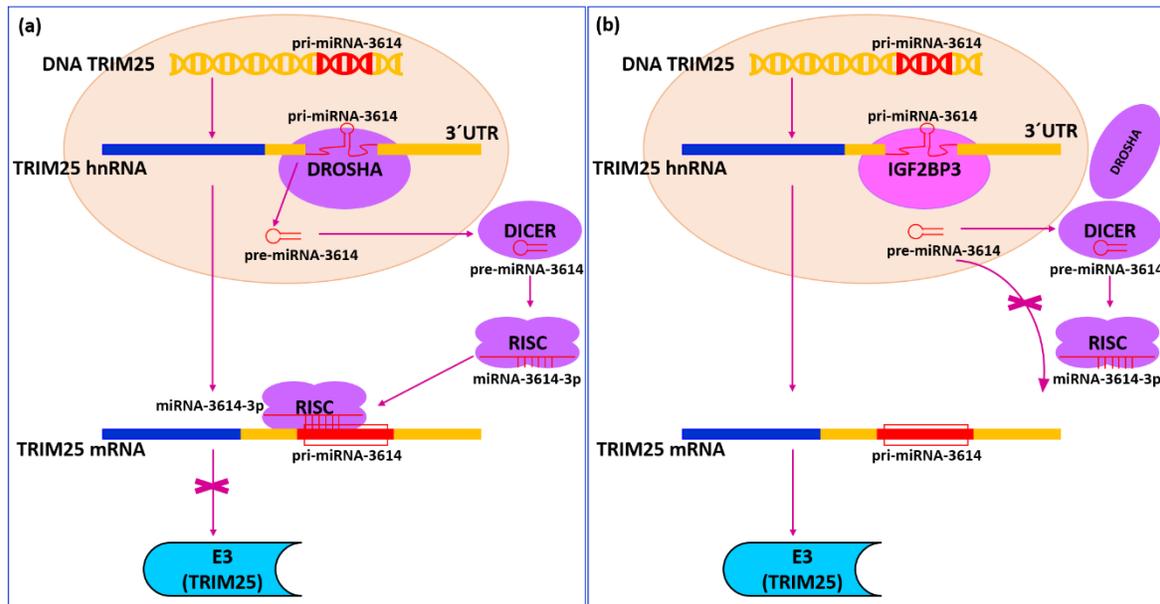
expresión controlada de miRNA ya que tienen un papel importante en casi todos los procesos biológicos conocidos, entre ellos: el desarrollo y la proliferación celular, la angiogénesis, el metabolismo, las propiedades de las células madre, la apoptosis, la secreción de proteínas y la infección viral, esto hace que los miRNA estén implicados en el cáncer, infecciones virales y enfermedades inmunes. Cualquier cambio en la expresión del miRNA puede afectar la homeostasis celular, por ejemplo, se ha descubierto que el agotamiento de los miRNA suprime la angiogénesis tumoral (Mishra et al., 2016; Tiwari et al., 2017).

Los miRNA se sintetizan como transcritos largos llamados pri-miRNA, estos son procesados por proteínas RNAsas III, DROSHA y DICER. El pri-miRNA se une a DROSHA para formar un pre-miRNA que en el citoplasma será transformado por DICER en un miRNA maduro, este último se unirá a las proteínas AGO para formar el complejo RISC (Wang et al., 2019). RISC es un complejo proteico de silenciamiento inducido por miRNA, está compuesto por cuatro proteínas Argonaute (AGO1-4) y proteínas GW182 de unión a Argonaute. La secuencia de miRNA dicta con que mRNA va a interactuar, sin embargo, el complejo RISC dirige al miRNA al mRNA diana y juntos se encargan del silenciamiento génico. Todas las proteínas del complejo RISC son esenciales en este proceso (Fabian & Sonenberg, 2012). Además, este tipo de regulación es un proceso dependiente de la complementariedad de la secuencia. El grado de complementariedad entre los miRNA y las regiones no traducidas 3'UTR de los RNAm diana determina si el RNA se degrada o se bloquea su traducción (de Sousa et al., 2019; Mishra et al., 2016).

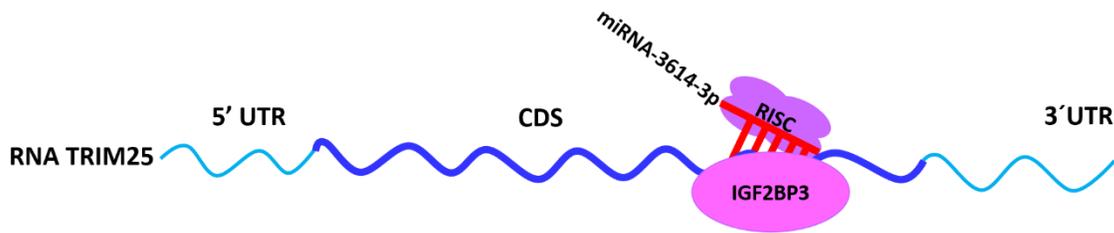
Las proteínas de unión a RNA (RBP) influyen en la biosíntesis y en la maduración de los RNA por lo que también son importantes reguladores postranscripcionales de la expresión génica. Esta familia de proteínas se compone de 800 miembros, uno de ellos es la proteína 3 de unión al mRNA del factor de crecimiento similar a la insulina 2 (IGF2BP3) que estabiliza y evita la descomposición del mRNA, por lo que facilita la traducción de numerosos mRNA diana (Wang et al., 2019).

TRIM25 es regulada por un miRNA de origen intragénico llamado miRNA-3614-3p, y por proteínas asociadas a mRNA, como IGF2BP3 (**Fig.11**). La región 3'UTR del

gen *TRIM25* contiene el pri-miARN-3614, así como un sitio de unión para miARN-3614-3p, y esta unión evita la expresión del gen *TRIM25*. La proteína IGF2BP3 inhibe la maduración del miRNA-3614 al unirse al extremo 3'UTR del gen *TRIM25*, además esta unión evita la unión del miRNA al gen *TRIM25*, permitiendo así una mayor expresión de *TRIM25*. La pérdida de IGF2BP3 genera una mayor expresión de miRNA-3614-3p y una menor traducción de TRIM25 (Wang et al., 2019).



**Figura 11.** Regulación de la expresión de TRIM25 está mediada por la proteína IGF2BP3 y el miRNA miRNA-3614-3p mediante su unión a la región 3'UTR de TRIM25. (a) La unión de miRNA 3614-3p al mRNA de TRIM25 reprime la traducción de la proteína TRIM25. (b) IGF2BP3 se une a la región 3'UTR de TRIM25 lo que inhibe la maduración del pri-miRNA (pri-miRNA-3614), mediante el conjunto de proteínas: RNAsas III (DROSHA y DICER) y el complejo de proteínas argonaute (RISC), evitando que miRNA-3614-3p se una al mRNA de TRIM25, generando una mayor producción de TRIM25. Modificada de Wang et al., 2019.



**Figura 12.** Se observa que el miRNA (miRNA-3614-3p) unido al complejo de proteínas argonaute (RISC) y la proteína IGF2BP3 compiten por la misma región, al final de la secuencia codificante (CDS) en la región no traducida 3' (3'UTR) del RNA de TRIM25. Tomada de Wang et al., 2019.

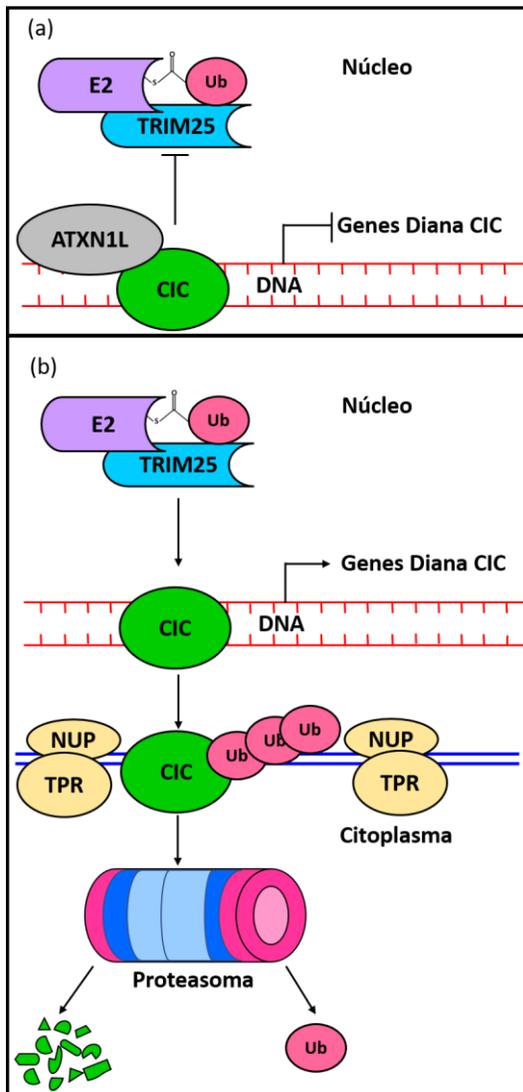
TRIM25 también es regulada por un supresor de tumores importante llamado p53, la activación de este supresor detiene el crecimiento celular e induce la apoptosis. La región promotora del gen TRIM25 contiene sitios de unión para p53, el cual induce su expresión (Park et al., 2016). TRIM25 aumenta los niveles de p53 al inhibir su ubiquitinación y por ende su degradación proteasomal. Mantener controlada la expresión de p53 es primordial en la proliferación celular y en la terapia del cáncer (Qin et al., 2015).

La expresión de TRIM25 impacta en otros elementos importantes del cáncer de mama como ER $\alpha$ . El gen que codifica ER $\alpha$  (*ESR1*) tiene regiones reguladoras en las que se une ZBTB7A para inducir su expresión en células de cáncer de mama. Sin embargo, también se ha encontrado que la inhibición de ZBTB7A regula al alza a TRIM25, lo cual se asocia a que, TRIM25 aumenta la degradación de ER $\alpha$  a través del sistema UPS (Xiao et al., 2019). TRIM25 tiene una expresión considerable en células madre embrionarias ya que participa en el mantenimiento del tallo pues regula genes como POU5F1, SOX2 y NANOG. Se cree que estos genes podrían estar asociados con la metástasis mediante la inducción de la colonización celular (Zhou & Costello, 2017).

## 10.-Capítulo 5

### *Implicaciones de TRIM25 en cáncer de mama*

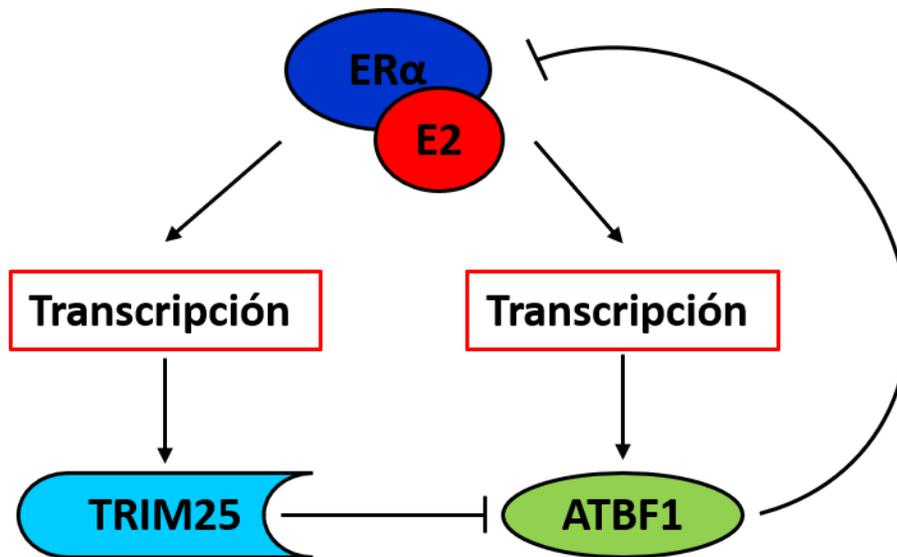
Como previamente se mencionó, TRIM25 es una proteína con actividad enzimática de ligasa E3 para la unión covalente de ISG15 y ubiquitina a sus sustratos. Sin embargo, los blancos de TRIM25 en contextos específicos son limitados, y principalmente se han descrito algunas proteínas modificadas por ubiquitinación a través de TRIM25. Por ejemplo, TRIM25 media la degradación de la proteína capicua (CIC), la cual tiene funciones supresoras de tumores y consecuentemente está implicada en un mejor pronóstico de diferentes tipos de cáncer, incluyendo cáncer de mama (**Fig.13**) (Tseng et al., 2007). La regulación a la baja de TRIM25 regula al alza los niveles de CIC. Por el contrario, la regulación al alza de TRIM25 regula a la baja los niveles de CIC, por lo que se ha sugerido que la degradación de CIC está mediada por TRIM25 a través de UPS. Además, se ha propuesto un mecanismo en el que la interacción de CIC con ATXN1L inhibe la degradación de CIC por TRIM25 (Wong et al., 2020).



**Figura 13.** TRIM25 implicada en la degradación de capicúa (CIC), un supresor tumoral. (a) El complejo CIC-ATXN1L inhibe la degradación de CIC por TRIM25. (b) La ausencia de la ataxina 1 (ATXN1L) permite que TRIM25 medie la ubiquitinación de CIC y a si salir atreves de las proteínas que forman el poro nuclear (NUP-TPR) para su posterior degradación proteasomal. Modificada de Wong et al., 2020.

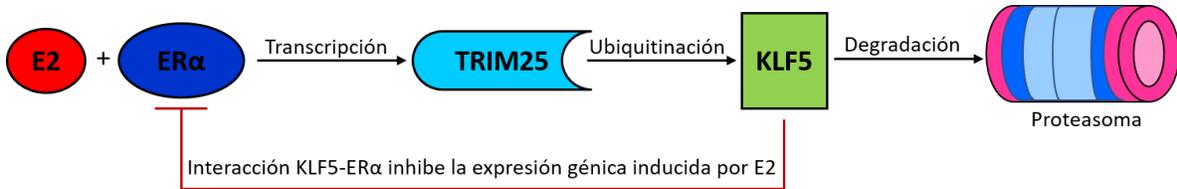
Otra proteína regulada por TRIM25 es el factor 1 de unión al motivo AT (ATBF1) que está implicado en la supresión de tumores mamarios (**Fig.14**). ER $\alpha$  regula positivamente la expresión de ATBF1 uniéndose directamente a su promotor. Sin embargo, TRIM25 promueve la degradación de ATBF1 a través del USP. Por tanto, la inhibición de la proliferación celular mediada por ATBF1 depende de su

estabilidad, que puede ser reducida por su degradación mediada por la actividad E3-Ub ligasa de TRIM25 (Dong et al., 2012).



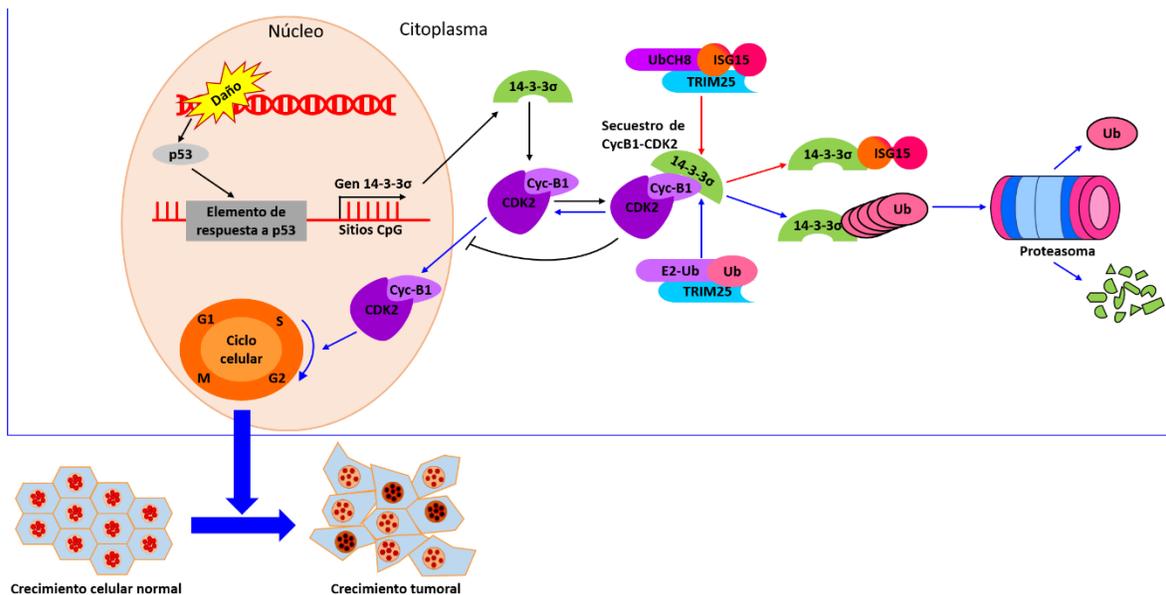
**Figura 14.** Aunque el complejo receptor de estrógenos  $\alpha$  unido a 17  $\beta$ -estradiol (ER $\alpha$ -E2) induce la transcripción tanto de TRIM25 como del factor 1 de unión al AT (ATBF1), TRIM25 participa en la degradación de ATBF1 que a su vez suprime la señalización de ER $\alpha$ -E2. Tomada de Dong et al., 2012.

Por otro lado, en las células de cáncer mamario, TRIM25, inducida por estrógenos, promueve también la degradación del factor Kruppel-like 5 (KLF5) mediante el UPS (**Fig. 15**). El factor KLF5 inhibe la expresión génica inducida por estrógenos y la proliferación celular, debido a que KLF5 interactúa con ER $\alpha$ . No obstante, KLF5 es regulada negativamente por estrógenos. La sobreexpresión de TRIM25 mejora su auto-ubiquitinación e inhibe la ubiquitinación de KLF5. TRIM25 ubiquitinada no puede interactuar con KLF5, mientras que TRIM25 no ubiquitinada puede interactuar con KLF5, para mediar su ubiquitinación y promover su degradación por el USP, favoreciendo las acciones pro-tumor de la señalización de estrógenos en células de cáncer de mama (Zhao et al., 2011).



**Figura 15.** La interacción del factor Kruppel-like 5 (KLF5) y el receptor de estrógenos  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) inhibe la expresión génica inducida por estrógenos (E2), sin embargo, esta interacción se bloquea cuando TRIM25 ubiquitina KLF5 para su posterior degradación. Modificada de Zhao et al., 2011.

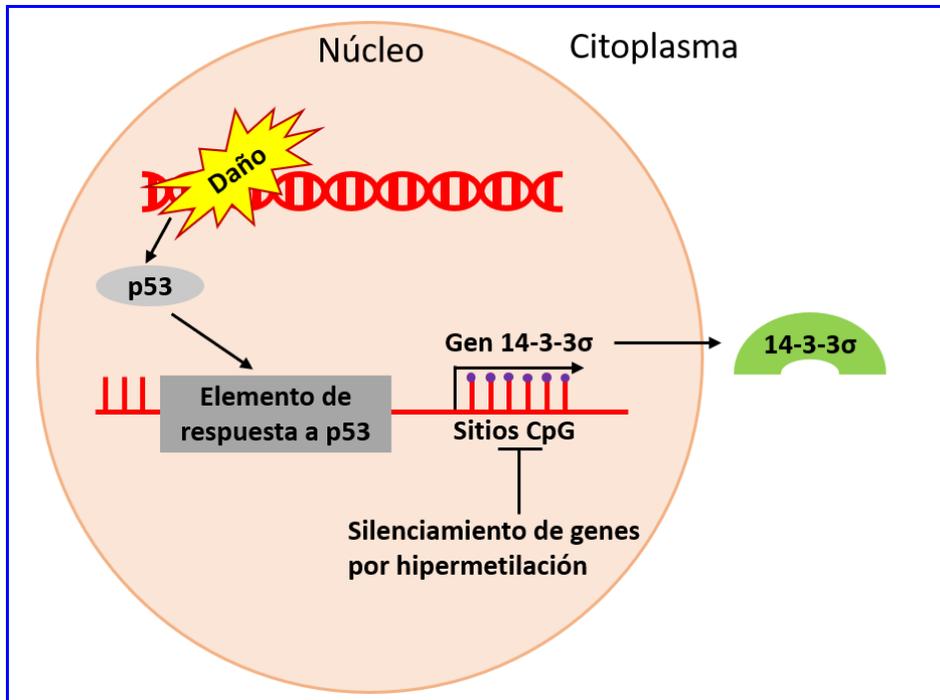
Otra proteína blanco de TRIM25 es 14-3-3 $\sigma$ , puede ser modificada por ISGilación y por ubiquitinación. 14-3-3 $\sigma$  es una proteína importante debido a su función supresora de tumores, siendo el cáncer de mama, una de las principales neoplasias malignas donde 14-3-3 $\sigma$  se encuentra desregulado (Ko et al., 2014). La proteína 14-3-3 $\sigma$ , cuya expresión es inducida por p53 cuando hay daño a DNA, secuestra los complejos de ciclina B1-CDK2 fuera del núcleo y promueve la detención del ciclo celular en el punto G2 (Horie-Inoue & Inoue, 2006; Ko et al., 2014; Qin et al., 2015).



**Figura 16.** Cuando hay daño al DNA se activa el supresor de tumore p53 generando la producción del regulador del ciclo celular 14-3-3 $\sigma$ , que puede secuestrar el

complejo ciclinas (CycB1-CDK2) impidiendo su entrada al núcleo y por tanto deteniendo el ciclo celular, sin embargo, cuando 14-3-3 $\sigma$  es ubiquitinada por TRIM25 el complejo CycB1-CDK2 queda libre para entrar al núcleo y promover el ciclo celular generando un crecimiento celular anormal. Modificada de Horie-Inoue & Inoue, 2006 y de Horie et al., 2003.

En algunos tumores malignos mamarios se detectó el silenciamiento de la expresión de 14-3-3 $\sigma$  asociado con hipermetilación del DNA (**Fig.17**) (Ko et al., 2014). Se sabe que en cáncer de mama TRIM25 está implicada en la degradación vía el UPS de 14-3-3 $\sigma$  (Horie et al., 2003; Urano et al., 2002). La degradación de 14-3-3 $\sigma$  es crítica debido a que promueve el crecimiento de tumores mamarios. La disminución en los niveles de la proteína 14-3-3 $\sigma$  ocurren de manera dependiente de la dosis de TRIM25 (Horie et al., 2003). Además, la sobreexpresión de TRIM25 regula notablemente a la baja los niveles de la proteína 14-3-3 $\sigma$ , y esto se puede mitigar empleando un tratamiento con MG132 (un potente inhibidor de la función del proteasoma). Por lo tanto, TRIM25 regula a la baja los niveles de 14-3-3 $\sigma$  a través de un mecanismo dependiente del proteasoma (Urano et al., 2002). Adicionalmente, TRIM25 dirige la degradación de otro supresor tumoral conocido como Keap1 en células de cáncer de mama. La degradación de Keap1 mediada por TRIM25 conduce la activación de Nrf2 promoviendo la proliferación y la supervivencia celular (Y. Liu et al., 2020).



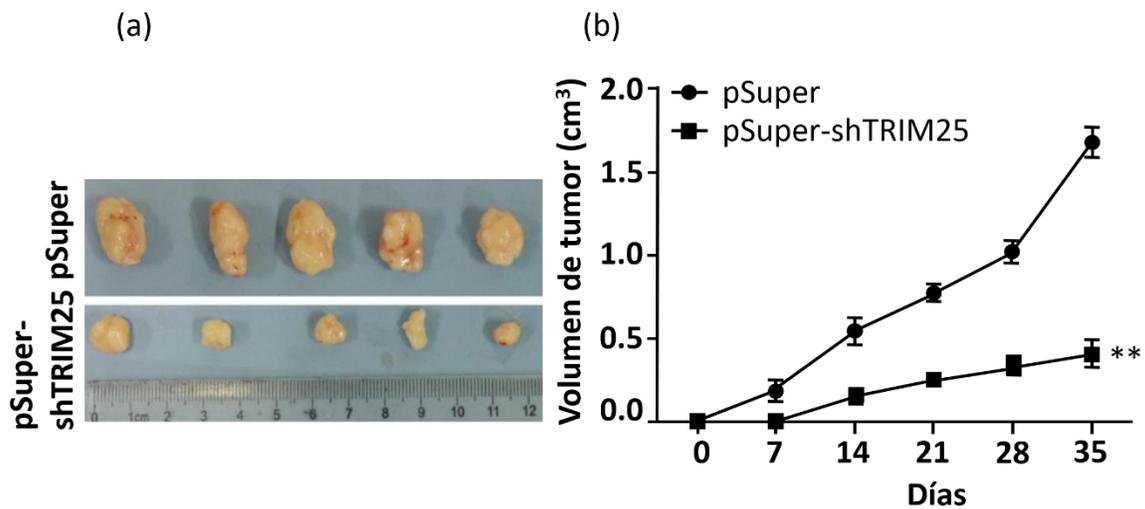
**Figura 17.** La hipermetilación de las islas CpG impiden la transcripción de los genes 14-3-3 $\sigma$  y por tanto la traducción de 14-3-3 $\sigma$ . Modificada de Horie-Inoue & Inoue, 2006.

A pesar de que las funciones de E3-Ub ligasa de TRIM25 han sido documentadas para algunas proteínas supresoras de tumores en cáncer de mama, su actividad como E3- ligasa de ISG15 es muy limitada a la fecha. Se sabe que la K11 de TRIM25 es requerida para su autoISGilación, por lo que la mutación de TRIM25, generada experimentalmente, en dicho residuo le confiere resistencia a su auto-ISGilación pero mejora la ISGilación de 14-3-3 $\sigma$ ; no obstante, en este trabajo no se reportan los efectos funcionales de la ISGilación de 14-3-3 $\sigma$ . Por lo tanto, la auto-ISGilación de TRIM25 inhibe la ISGilación de su proteína diana 14-3-3 $\sigma$  y podría afectar la ISGilación de otras proteínas blanco, pero se requieren más estudios (Zou et al., 2007).

Dadas las funciones de TRIM25, principalmente como una E3-Ub ligasa que la hace estar implicada en la degradación de supresores tumorales en el contexto de cáncer de mama, TRIM25 parece ser un elemento clave involucrado en las vías moleculares que modifican el proteoma en tumores mamarios en comparación con

tejido mamario normal (Sato et al., 2018). Se ha encontrado que la implantación de células MCF-7 transfectadas con TRIM25 en ratones ovariectomizado genera la formación de tumores, mientras que la implantación de células MCF-7 transfectadas con un vector vacío no genera la formación de tumores (Urano et al., 2002). En cáncer de mama un desequilibrio de TRIM25 se asocia positivamente con metástasis en los ganglios linfáticos y con un pronóstico poco favorable para los pacientes (Qin et al., 2015).

Cabe mencionar que, TRIM25 no solo está desregulado en cáncer de mamá, también está desregulado en cáncer de ovario, endometrio y pulmón. Por mencionar un ejemplo, se cuenta con las aportaciones de Qin et al., 2015, que en conjunto sugieren que TRIM25 es un regulador importante de la proliferación de células con cáncer de pulmón *in vivo* (**Fig.18**). Al respecto, estudios similares podrían realizarse para corroborar la importancia de la expresión de TRIM25 y sus acciones en el desarrollo de tumores mamarios.



**Figura 18.** La sobre expresión de TRIM25 en cáncer de pulmón regula la proliferación de células tumorales. En la investigación de Qin et al., 2015, el modelo de xenoinjerto se llevó a cabo en ratones de 4-5 semanas de edad, se formaron dos grupos (n=5/grupo). El grupo control se inoculó con células A427-pSuper (pSuper). El otro grupo se inoculó con células A427-shTRIM25 (pSuper-shTRIM25). El tamaño del tumor fue medido en centímetros cúbicos (cm<sup>3</sup>) diariamente por 35 días.

Después de 35 días los tumores de células A427-shTRIM25 crecieron menos que los tumores de las células control. Para el análisis de datos se usó una prueba t a dos colas y una  $p < 0.05$ . Tomada de Qin et al., 2015.

Adicionalmente, se ha sugerido la función potencial de TRIM25 como factor de transcripción a través de los dedos de zinc de su dominio B-box (Zhou et al., 2017), pero se desconocen cuáles podrían ser sus genes blanco de modulación en diferentes contextos, lo cual es un aspecto que también demanda atención. Un estudio identificó que TRIM25 podría asociarse a regiones regulatorias ricas en GC de varios genes en células de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231 mediante la técnica de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) seguido de secuenciación masiva (ChIP-seq). También identificaron mRNA blanco donde TRIM25 podría unirse mediante la técnica de inmunoprecipitación de RNA (RIP) seguido de secuenciación masiva (RIP-seq). Los datos fueron analizados e integrados con resultados de RNA-seq, los cuales mostraban los genes afectados por la reducción de la expresión de TRIM25 por efecto de un RNA interferente específico. De esta forma, dicha investigación sugiere que TRIM25 podría modular la expresión de sus blancos a nivel transcripcional y postranscripcional en cáncer de mama, principalmente en los tumores metastásicos (Walsh et al., 2017).

## **11.-Discusión de resultados**

Debido a que el cáncer de mama es un problema con prioridad mundial es necesario encontrar una alternativa a las terapias ya existentes, pues algunas de ellas no muestran el efecto deseado debido a la resistencia *de novo* o adquirida, además de que un porcentaje considerable de los pacientes que recibe tratamiento contra un tumor mamario primario desarrolla metástasis y 90% de esta población muere.

El 80% de los casos de cáncer de mama se presentan en la edad adulta después de haber estado expuestos a condiciones ambientales desfavorables como la radiación, la contaminación, infecciones virales y posiblemente haber llevado un estilo de vida poco saludable. Por lo tanto, son varios los factores que podrían desencadenar el desarrollo de células cancerosas en el tejido mamario, sin embargo, se ha observado que la mayor proliferación de este carcinoma es una

respuesta a la presencia de estrógenos involucrados con ER $\alpha$ , es por ellos que el 75% de los casos de cáncer de mama expresan niveles altos de ER $\alpha$ . Los estrógenos para llevar a cabo su actividad pro-tumor en un contexto de cáncer de mama, necesitan interactuar con receptores de estrógenos como ER $\alpha$ . De manera interesante, TRIM25 es inducida por estrógenos y se regula al alza en los tumores mamarios, participando en el crecimiento celular y desarrollo de cáncer de mama. Estos datos sugieren el potencial de TRIM25 para considerarse un biomarcador en cáncer de mama.

Por otro lado, la presencia de IFNs favorece la expresión de *ISG15* y *TRIM25* generando que el DNA sea sensible al daño por anticancerígenos como las camptotencinas, por lo que es importante determinar si podría ocurrir la ISGilación dependiente de TRIM25 en las proteínas blanco de los quimioterapéuticos, y de ser el caso, cuál es su efecto sobre la unión del fármaco-proteína y en el control de la progresión cáncer mama. Por lo tanto, aunque un aumento en la expresión de *TRIM25* parece promover la progresión del cáncer de mama, también podría ser un indicativo positivo de la capacidad de las células a responder a tratamientos contra este cáncer.

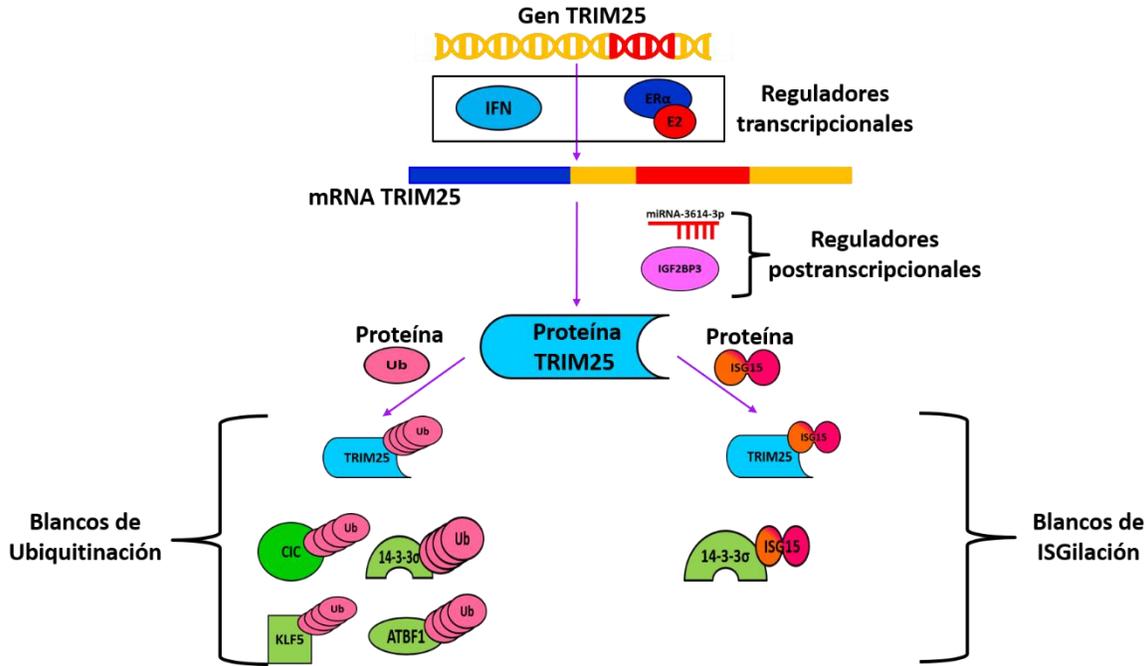
Además, se ha observado que en cáncer de mama la ISGilación de NMIIA y de IQGPA1 aumenta, lo cual es importante dado que ambas proteínas participan en la reorganización citoesquelética y la migración celular. Resultaría relevante analizar si la ISGilación de estas proteínas ocurre a través de TRIM25 en respuesta a un microambiente tumoral enriquecido por IFN- $\gamma$ . Evitar la expresión de TRIM25 podría ser un punto clave para frenar el desarrollo del cáncer de mama, una forma de hacerlo sería induciendo la expresión de miRNA-36-14-3p, otra forma de sería frenando la producción de IGF2BP3 o evitando la unión de IGF2BP3 a su región de reconocimiento en el pri-miRNA-36-14. Como resultado de la inhibición de TRIM25, podría ocurrir una menor ISGilación de algunas proteínas, afectando procesos como la migración de células cancerosas.

Hay que resaltar que la proteína supresora de tumores 14-3-3 $\sigma$  también puede ser ubiquitinada por TRIM25. Sin embargo 14-3-3 $\sigma$  puede ser un blanco de ISGilacion

por TRIM25, queda por averiguar si la ISGilación de 14-3-3 $\sigma$  evita su ubiquitinación y su efecto sobre su función supresora de tumores. No obstante, se requieren más estudios sobre TRIM25 y su actividad como E3-ligasa de ISG15 y sus efectos. Hasta ahora, la mayor parte de los estudios se centran en su actividad como E3-Ub ligasa, participando en la degradación de elementos que inhiben el desarrollo celular como ATBF1 y KLF5, esto indica que la actividad ligasa E3-Ub de TRIM25 contribuye al crecimiento celular y es una actividad que se podría frenar para evitar el desarrollo tumoral. Por lo tanto, promover la autoubiquitinación de TRIM25 podría ser una estrategia para evitar la degradación de factores supresores de tumores.

Un último punto a investigar es cómo TRIM25 podría estar implicado en la ISGilación de proteínas, cuáles serían sus proteínas blanco y los efectos funcionales resultantes. Dado que TRM25 tiene en su extremo C-terminal al dominio PRY-SPRY, dicho dominio podría estar involucrado en las interacciones proteína-proteína y en la unión a ácidos nucleicos. Es conveniente estudiar qué papel juega TRIM25 en el carcinoma mamario cuando se bloquea la función de su dominio RING ( el cual tiene un papel fundamental en la ubiquitinación), pero también cuando se bloquea la actividad de sus dominios implicados en la unión al DNA y RNA . Cabe mencionar que la interacción deTRIM25 con los ácidos nucleicos es aún menos estudiado, y aún debe ser investigado en el contexto de cáncer, particularmente en cáncer de mama.

En la **figura 19**, se muestran los principales factores reportados hasta ahora, implicados en su regulación a nivel transcripcional, postranscripcional y postraducciona, así como sus principales funciones en cáncer de mama. Estos datos en conjunto, muestran la complejidad de TRIM25 tanto en su regulación como en sus actividades en cáncer de mama, y la importancia de profundizar en los mecanismos moleculares implicados.



**Figura 19:** Regulación a nivel transcripcional y postranscripcional de TRIM25. TRIM25 se puede regular transcripcionalmente por interferones (IFN) y por el receptor de estrógenos  $\alpha$  unido a estradiol (E2). Postranscripcionalmente puede ser regulada por el miRNA, miRNA-3614-3p, y por la proteína IGF2BP3. TRIM25 puede tener actividad de ligasa E3 en los procesos de ubiquitinación y de ISGilación. Se sabe que un blanco de ISGilación mediado por TRIM25 es el regulador del ciclo celular 14-3-3 $\sigma$ , sin embargo, se conocen varios blancos de ubiquitinación mediados por TRIM25, como lo es el mismo 14-3-3 $\sigma$ , la capicula (CIC), el factor de unión a AT1 y el factor Kruppel-like 5 (KLF5).

## 12.-Conclusiones

La proteína TRIM25 regula la actividad de muchas proteínas con actividad oncosupresora, pero también se ha relacionado con una actividad pro-tumorigénica. La ambigüedad de sus funciones puede estar relacionadas a su función dual como una E3 ligasa para el sistema de ISGilación, pero también para el sistema de ubiquitinación. Sin embargo, TRIM25 parece actuar como una oncoproteína en cáncer de mama. Las características estructurales de TRIM25 la relacionan con

funciones de unión a DNA, RNA y a proteínas, probablemente para modular a diferentes niveles la expresión génica. Por lo tanto, se requieren más investigaciones para entender sus mecanismos moleculares de acción, de regulación y sus implicaciones en la progresión de los tumores mamarios. Estos aspectos son centrales para determinar su potencial como biomarcador y blanco terapéutico.

### 13.-Referencias

- Aleskandarany, M. A., Abduljabbar, R., Ashankyty, I., Elmouna, A., Jerjees, D., Ali, S., Buluwela, L., Diez-Rodriguez, M., Caldas, C., Green, A. R., Ellis, I. O., & Rakha, E. A. (2016). Prognostic significance of androgen receptor expression in invasive breast cancer: transcriptomic and protein expression analysis. *Breast Cancer Research and Treatment*, *159*(2), 215–227. <https://doi.org/10.1007/s10549-016-3934-5>
- Andersson, R., & Sandelin, A. (2020). Determinants of enhancer and promoter activities of regulatory elements. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 21, Issue 2, pp. 71–87). Springer US. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0173-8>
- Basters, A., Geurink, P. P., El Oualid, F., Ketscher, L., Casutt, M. S., Krause, E., Ovaa, H., Knobloch, K. P., & Fritz, G. (2014). Molecular characterization of ubiquitin-specific protease 18 reveals substrate specificity for interferon-stimulated gene 15. *FEBS Journal*, *281*(7), 1918–1928. <https://doi.org/10.1111/febs.12754>
- Bergin, A. R. T., & Loi, S. (2019). Triple-negative breast cancer: recent treatment advances. *F1000Research*, *8*, 1342. <https://doi.org/10.12688/f1000research.18888.1>
- Bertucci, F., Finetti, P., & Birnbaum, D. (2012). Basal Breast Cancer: A Complex and Deadly Molecular Subtype. *Current Molecular Medicine*, *12*(1), 96–110. <https://doi.org/10.2174/156652412798376134>
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *68*(6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Burks, J., Reed, R. E., & Desai, S. D. (2014). ISGylation governs the oncogenic function of Ki-Ras in breast cancer. *Oncogene*, *33*(6), 794–803. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.633>
- Burks, Julian, Reed, R. E., & Desai, S. D. (2015). Free ISG15 triggers an antitumor immune response against breast cancer: A new perspective. *Oncotarget*, *6*(9), 7221–7231. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3372>
- Cerikan, Berati; Schiebel, Elmar (2016). *DOCK6 inactivation highlights ISGylation as RHO-GTPase balancer*. *Cell Cycle*, *16*(4), 304–305. doi:10.1080/15384101.2016.1256153
- Cruz-Ramos, E., Macías-Silva, M., Sandoval-Hernández, A., & Tecalco-Cruz, A. C. (2019). Non-muscle myosin IIA is post-translationally modified by interferon-stimulated gene 15 in breast cancer cells. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, *107*(November 2018), 14–26.

<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2018.12.002>

- Dai, X., Xiang, L., Li, T., & Bai, Z. (2016). Cancer hallmarks, biomarkers and breast cancer molecular subtypes. *Journal of Cancer*, 7(10), 1281–1294. <https://doi.org/10.7150/jca.13141>
- de Sousa, M. C., Gjorgjieva, M., Dolicka, D., Sobolewski, C., & Foti, M. (2019). Deciphering miRNAs' action through miRNA editing. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(24). <https://doi.org/10.3390/ijms20246249>
- Desai, S. D., Reed, R. E., Burks, J., Wood, L. M., Pullikuth, A. K., Haas, A. L., Liu, L. F., Breslin, J. W., Meiners, S., & Sankar, S. (2012). ISG15 disrupts cytoskeletal architecture and promotes motility in human breast cancer cells. *Experimental Biology and Medicine*, 237(1), 38–49. <https://doi.org/10.1258/ebm.2011.011236>
- Dong, X., Fu, X., Fan, S., Guo, P., Su, D., Dong, J., & A-motif, A. (2012). Oestrogen causes *ATBF1* protein degradation through the oestrogen-responsive *E3* ubiquitin ligase *EFP*. 590, 581–590. <https://doi.org/10.1042/BJ20111890>
- Fabian, M. R., & Sonenberg, N. (2012). The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: A look under the hood of miRISC. *Nature Structural and Molecular Biology*, 19(6), 586–593. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2296>
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Mathers, C., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A., & Bray, F. (2019). Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *International Journal of Cancer*, 144(8), 1941–1953. <https://doi.org/10.1002/ijc.31937>
- Goldhirsch, A., Winer, E. P., Coates, A. S., Gelber, R. D., Piccart-Gebhart, M., Thürlimann, B., Senn, H. J., Albain, K. S., André, F., Bergh, J., Bonnefoi, H., Bretel-Morales, D., Burstein, H., Cardoso, F., Castiglione-Gertsch, M., Coates, A. S., Colleoni, M., Costa, A., Curigliano, G., ... Wood, W. C. (2013). Personalizing the treatment of women with early breast cancer: Highlights of the st gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast Cancer 2013. *Annals of Oncology*, 24(9), 2206–2223. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdt303>
- Hatakeyama, S. (2017). TRIM Family Proteins : Roles in. *Trends in Biochemical Sciences*, xx, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.01.002>
- Hill, M., & Tran, N. (2021). miRNA interplay: Mechanisms and consequences in cancer. *DMM Disease Models and Mechanisms*, 14(4), 1–9. <https://doi.org/10.1242/dmm.047662>
- Horie-Inoue, K., & Inoue, S. (2006). Epigenetic and proteolytic inactivation of 14-3-3 $\sigma$  in breast and prostate cancers. *Seminars in Cancer Biology*, 16(3), 235–239.

<https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2006.03.006>

- Horie, K., Urano, T., Ikeda, K., & Inoue, S. (2003). Estrogen-responsive RING finger protein controls breast cancer growth. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 85(2–5), 101–104. [https://doi.org/10.1016/S0960-0760\(03\)00209-7](https://doi.org/10.1016/S0960-0760(03)00209-7)
- Howell, S. J., Johnston, S. R. D., & Howell, A. (2004). The use of selective estrogen receptor modulators and selective estrogen receptor down-regulators in breast cancer. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*, 18(1), 47–66. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2003.08.002>
- Ikeda, K., & Inoue, S. (2004). *Estrogen receptors and their downstream targets in cancer*. 67(5), 435–442.
- Ikeda, K., Orimo, A., Higashi, Y., Muramatsu, M., & Inoue, S. (2000). Efp as a primary estrogen-responsive gene in human breast cancer. *FEBS Letters*, 472(1), 9–13. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01421-6](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01421-6)
- Januškevičienė, I., & Petrikaitė, V. (2019). Heterogeneity of breast cancer: The importance of interaction between different tumor cell populations. *Life Sciences*, 239, 117009. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.117009>
- Kawai, T., & Akira, S. (2011). Regulation of innate immune signalling pathways by the tripartite motif (TRIM) family proteins. *EMBO Molecular Medicine*, 3(9), 513–527. <https://doi.org/10.1002/emmm.201100160>
- Ko, S. S., Kim, J. Y., Jeong, J., Lee, J. E., Yang, W. I., & Jung, W. H. (2014). The role and regulatory mechanism of 14-3-3 sigma in human breast cancer. *Journal of Breast Cancer*, 17(3), 207–218. <https://doi.org/10.4048/jbc.2014.17.3.207>
- Kolak, A., Kamińska, M., Sygit, K., Budny, A., Surdyka, D., Kukielka-Budny, B., & Burdan, F. (2017). Primary and secondary prevention of breast cancer. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 24(4), 549–553. <https://doi.org/10.26444/aaem/75943>
- Kumar, R., Zakharov, M. N., Khan, S. H., Miki, R., Jang, H., Toraldo, G., Singh, R., Bhasin, S., & Jasuja, R. (2011). The Dynamic Structure of the Estrogen Receptor. *Journal of Amino Acids*, 2011, 1–7. <https://doi.org/10.4061/2011/812540>
- Kuslansky, Y., Sominsky, S., Jackman, A., Gamell, C., Monahan, B. J., Haupt, Y., Rosin-Arbesfeld, R., & Sherman, L. (2016). Ubiquitin ligase E6AP mediates nonproteolytic polyubiquitylation of  $\beta$ -catenin independent of the E6 oncoprotein. *Journal of General Virology*, 97(12), 3313–3330. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000624>
- Kwon, S. C., Yi, H., Eichelbaum, K., Föhr, S., Fischer, B., You, K. T., Castello, A.,

- Krijgsveld, J., Hentze, M. W., & Kim, V. N. (2013). The RNA-binding protein repertoire of embryonic stem cells. *Nature Structural and Molecular Biology*, *20*(9), 1122–1130. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2638>
- Legrier, M. E., Bièche, I., Gaston, J., Beurdeley, A., Yvonnet, V., Déas, O., Thuleau, A., Château-Joubert, S., Servely, J. L., Vacher, S., Lassalle, M., Depil, S., Tucker, G. C., Fontaine, J. J., Poupon, M. F., Roman-Roman, S., Judde, J. G., Decaudin, D., Cairo, S., & Marangoni, E. (2016). Activation of IFN/STAT1 signalling predicts response to chemotherapy in oestrogen receptor-negative breast cancer. *British Journal of Cancer*, *114*(2), 177–187. <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.398>
- Liang, Y., Zhang, H., Song, X., & Yang, Q. (2020). Metastatic heterogeneity of breast cancer: Molecular mechanism and potential therapeutic targets. *Seminars in Cancer Biology*, *60*(April), 14–27. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.08.012>
- Liu, N., Johnson, K. J., & Ma, C. X. (2018). Male Breast Cancer: An Updated Surveillance, Epidemiology, and End Results Data Analysis. *Clinical Breast Cancer*, *18*(5), e997–e1002. <https://doi.org/10.1016/j.clbc.2018.06.013>
- Liu, Y., Tao, S., Liao, L., Li, Y., Li, H., Li, Z., Lin, L., Wan, X., Yang, X., & Chen, L. (2020). TRIM25 promotes the cell survival and growth of hepatocellular carcinoma through targeting Keap1-Nrf2 pathway. *Nature Communications*, *11*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-14190-2>
- Mader, S., Chambon, P., & White, J. H. (1993). Defining a minimal estrogen receptor DNA binding domain. *Nucleic Acids Research*, *21*(5), 1125–1132. <https://doi.org/10.1093/nar/21.5.1125>
- Malakhov, M. P., Kim, K. Il, Oxana, A., Jacobs, B. S., Ernest, C., Zhang, D., Malakhov, M. P., Kim, K. Il, Malakhova, O. A., Jacobs, B. S., Borden, E. C., & Zhang, D. (2003). High-throughput immunoblotting Ubiquitin-like protein ISG15 modifies key regulators of signal transduction. *The journal of biological chemistry*, *278*(19), 16608–16613. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208435200>.
- Mao, R., Wu, Y., Ming, Y., Xu, Y., Wang, S., Chen, X., Wang, X., & Fan, Y. (2018). *Enhancer RNAs : a missing regulatory layer in gene transcription*. 1–8.
- Martín-Vicente, M., Medrano, L. M., Resino, S., García-Sastre, A., & Martínez, I. (2017). TRIM25 in the regulation of the antiviral innate immunity. *Frontiers in Immunology*, *8*(SEP), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01187>
- Menen, R. S., & Hunt, K. K. (2016). Considerations for the Treatment of Young Patients with Breast Cancer. *Breast Journal*, *22*(6), 667–672. <https://doi.org/10.1111/tbj.12644>
- Métivier, R., Penot, G., Flouriot, G., & Pakdel, F. (2001). Synergism between ERα

- transactivation function 1 (AF-1) and AF-2 mediated by steroid receptor coactivator protein-1: Requirement for the AF-1  $\alpha$ -helical core and for a direct interaction between the N- and C-terminal domains. *Molecular Endocrinology*, *15*(11), 1953–1970. <https://doi.org/10.1210/me.15.11.1953>
- Mishra, S., Yadav, T., & Rani, V. (2016). Exploring miRNA based approaches in cancer diagnostics and therapeutics. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, *98*, 12–23. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.10.003>
- Moran, M. S. (2015). Radiation therapy in the locoregional treatment of triple-negative breast cancer. *The Lancet Oncology*, *16*(3), e113–e122. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)71104-0](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)71104-0)
- Narasimhan, J., Wang, M., Fu, Z., Klein, J. M., Haas, A. L., & Kim, J. J. P. (2005). Crystal structure of the interferon-induced ubiquitin-like protein ISG15. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(29), 27356–27365. <https://doi.org/10.1074/jbc.M502814200>
- Ohta, T., & Fukuda, M. (2004). Ubiquitin and breast cancer. *Oncogene*, *23*(11 REV. ISS. 1), 2079–2088. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207371>
- Osborne, C. K., & Schiff, R. (2011). Mechanisms of endocrine resistance in breast cancer. *Annual Review of Medicine*, *62*, 233–247. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-070909-182917>
- Ozato, K. (2008). NIH Public Access. *Bone*, *23*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Park, J. H., Yang, S. W., Park, J. M., Ka, S. H., Kim, J., Kong, Y., Jeon, Y. J., Seol, J. H., & Chung, C. H. (2016). Positive feedback regulation of p53 transactivity by DNA damage-induced ISG15 modification. *Nature Communications*, *7*, 1–13. <https://doi.org/10.1038/ncomms12513>
- Popovic, D., Vucic, D., & Dikic, I. (2014). review Ubiquitination in disease pathogenesis and treatment. *20*(11), 1242–1253. <https://doi.org/10.1038/nm.3739>
- Prebys, S. B. (2017). Ubiquitin ligases in oncogenic transformation and cancer therapy. *Nature Publishing Group*. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.105>
- Prossnitz, E. R., & Barton, M. (2011). The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. *Nature Reviews Endocrinology*, *7*(12), 715–726. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2011.122>
- Qin, Y., Cui, H., & Zhang, H. (2015). Overexpression of TRIM25 in Lung Cancer Regulates Tumor Cell Progression. *Technology in Cancer Research and Treatment*, *15*(5), 707–715. <https://doi.org/10.1177/1533034615595903>

- Sachdev, J. C., Sandoval, A. C., & Jahanzeb, M. (2019). Update on Precision Medicine in Breast Cancer. In *Cancer Treatment and Research* (Vol. 178).  
[https://doi.org/10.1007/978-3-030-16391-4\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-030-16391-4_2)
- Sadowski, M., Suryadinata, R., Tan, A. R., Nur, S., Roesley, A., & Sarcevic, B. (2012). *Critical Review Protein Monoubiquitination and Polyubiquitination Generate Structural Diversity to Control Distinct Biological Processes*. *64*(August 2011), 136–142. <https://doi.org/10.1002/iub.589>
- Sato, W., Ikeda, K., Urano, T., Abe, Y., Nakasato, N., Horie-Inoue, K., Takeda, S., & Inoue, S. (2018). Efp promotes in vitro and in vivo growth of endometrial cancer cells along with the activation of nuclear factor- $\kappa$ B signaling. *PLoS ONE*, *13*(12), 1–19.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208351>
- Swatek, K. N., & Komander, D. (2016). Ubiquitin modifications. *Nature Publishing Group*, *26*(4), 399–422. <https://doi.org/10.1038/cr.2016.39>
- Tecalco-cruz, A. C., Cortés-gonzález, C. C., Cruz-ramos, E., Ramírez, J. O., Romero-mandujano, A. K., & Sosa-garrocho, M. (2019). Interplay between interferon-stimulated gene 15 / ISGylation and interferon gamma signaling in breast cancer cells. *Cellular Signalling*, *54*(November 2018), 91–101.  
<https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2018.11.021>
- Tecalco, A. C., Josué, C., Jarquín, O. R., & Cruz, E. (2020). Regulation and action of interferon - stimulated gene 15 in breast cancer cells. *Human Cell*, *0123456789*.  
<https://doi.org/10.1007/s13577-020-00414-x>
- Tiwari, A., Mukherjee, B., & Dixit, M. (2017). MicroRNA Key to Angiogenesis Regulation: MiRNA Biology and Therapy. *Current Cancer Drug Targets*, *18*(3), 266–277. <https://doi.org/10.2174/1568009617666170630142725>
- Tsang, J. Y. S., & Tse, G. M. (2020). Molecular Classification of Breast Cancer. *Advances in Anatomic Pathology*, *27*(1), 27–35.  
<https://doi.org/10.1097/PAP.0000000000000232>
- Tseng, A. S. K., Tapon, N., Kanda, H., Cigizoglu, S., Edelmann, L., Pellock, B., White, K., & Hariharan, I. K. (2007). Capicua Regulates Cell Proliferation Downstream of the Receptor Tyrosine Kinase/Ras Signaling Pathway. *Current Biology*, *17*(8), 728–733.  
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.03.023>
- Turashvili, G., & Brogi, E. (2017). Tumor heterogeneity in breast cancer. *Frontiers in Medicine*, *4*(DEC). <https://doi.org/10.3389/fmed.2017.00227>
- Urano, T., Saito, T., Tsukui, T., Fujita, M., Hosoi, T., Muramatsu, M., Ouchi, Y., & Inoue, S. (2002). Efp targets 14-3-3 $\pm$  for proteolysis and promotes breast tumour growth.

- Nature*, 417(6891), 871–876. <https://doi.org/10.1038/nature00826>
- Van Gent, M., Sparrer, K. M. J., & Gack, M. U. (2018). TRIM proteins and their roles in antiviral host defenses. *Annual Review of Virology*, 5(June), 385–405. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-092917-043323>
- Walsh, L. A., Alvarez, M. J., Sabio, E. Y., Reyngold, M., Makarov, V., Mukherjee, S., Lee, K. W., Desrichard, A., Turcan, Ş., Dalin, M. G., Rajasekhar, V. K., Chen, S., Vahdat, L. T., Califano, A., & Chan, T. A. (2017). An integrated systems biology approach identifies TRIM25 as a key determinant of breast cancer metastasis. *Cell Reports*, 20(7), 1623–1640. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.07.052>
- Wang, Z., Tong, D., Han, C., Zhao, Z., Wang, X., Jiang, T., Li, Q., Liu, S., Chen, L., Chen, Y., Li, A., & Huang, C. (2019). Blockade of miR-3614 maturation by IGF2BP3 increases TRIM25 expression and promotes breast cancer cell proliferation. *EBioMedicine*, 41, 357–369. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.12.061>
- Wardell, S. E., Marks, J. R., & McDonnell, D. P. (2011). The turnover of estrogen receptor  $\alpha$  by the selective estrogen receptor degrader (SERD) fulvestrant is a saturable process that is not required for antagonist efficacy. *Biochemical Pharmacology*, 82(2), 122–130. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.03.031>
- Watanabe, M., & Hatakeyama, S. (2017). JB special review - Recent topics in ubiquitin-proteasome system and autophagy: TRIM proteins and diseases. *Journal of Biochemistry*, 161(2), 135–144. <https://doi.org/10.1093/jb/mvw087>
- Williams, F. P., Haubrich, K., Perez-Borrajero, C., & Hennig, J. (2019). Emerging RNA-binding roles in the TRIM family of ubiquitin ligases. *Biological Chemistry*, 400(11), 1443–1464. <https://doi.org/10.1515/hsz-2019-0158>
- Wong, D., Sogerer, L., Lee, S. S., Wong, V., Lum, A., Levine, A. B., Marra, M. A., & Yip, S. (2020). TRIM25 promotes Capicua degradation independently of ERK in the absence of ATXN1L. *BMC Biology*, 18(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12915-020-00895-0>
- Xiao, X., Shen, Y., Yin, L., He, J., Ni, X., Luo, G., Chen, X., Zhu, W., Zhong, J., Liu, J., Peng, X., & Zu, X. (2019). Knockdown of ZBTB7A inhibits cell proliferation of breast cancer through regulating the ubiquitination of estrogen receptor alpha. *Life Sciences*, 239(October), 117042. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.117042>
- Zhang, D., & Zhang, D. (2011). *Interferon-Stimulated Gene 15 and the Protein ISGylation System*. 31(1). <https://doi.org/10.1089/jir.2010.0110>
- Zhao, K., Sikriwal, D., Dong, X., Guo, P., Sun, X., & Dong, J. (2011). *Oestrogen causes degradation of KLF5 by inducing the E3 ubiquitin ligase EFP in ER-positive breast*

*cancer cells*. 333, 323–333. <https://doi.org/10.1042/BJ20101388>

Zhou, H., & Costello, J. C. (2017). All Paths Lead to TRIM25. *Trends in Cancer*, 3(10), 673–675. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2017.08.005>

Zou, W., Wang, J., & Zhang, D. E. (2007). Negative regulation of ISG15 E3 ligase EFP through its autoISGylation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 354(1), 321–327. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.12.210>

Zwart, W., De Leeuw, R., Rondaij, M., Neefjes, J., Mancini, M. A., & Michalides, R. (2010). The hinge region of the human estrogen receptor determines functional synergy between AF-1 and AF-2 in the quantitative response to estradiol and tamoxifen. *Journal of Cell Science*, 123(8), 1253–1261. <https://doi.org/10.1242/jcs.061135>